

ZÜCHTUNG VON ZELLKULTUREN AUS  
LEUCOPHAEA MADERAE F. (BLATTARIA)  
UND IHRE VERWENDUNG ZUR VERMEHRUNG  
ANIMALER VIRUSARTEN

GERALD JENTSCH

1973







Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektions-  
krankheiten der Tiere der Universität  
München  
Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr

---

Züchtung von Zellkulturen aus  
Leucophaea maderae F. (Blattaria) und ihre Verwendung  
zur Vermehrung animaler Virusarten.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Gerald Jentsch  
aus Oebisfelde/Altmark  
München 1974



1. Referent: Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr
2. Referent: Prof.Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 4. April 1973

Meiner Familie



|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| A. EINLEITUNG                                                        | 1  |
| B. SCHRIFTTUM                                                        | 3  |
| 1. <u>Die Entwicklung der in-vitro-Kultur von Arthropodengeweben</u> | 3  |
| 1.1. Historischer Überblick                                          | 3  |
| 1.2. Auswahl von Geweben für die Kultivierung in-vitro               | 5  |
| 1.2.1. Ovarien                                                       | 5  |
| 1.2.2. Larvaes und embryonales Gewebe                                | 6  |
| 1.2.3. Gewebe aus Puppen                                             | 7  |
| 1.2.4. Hämocyten                                                     | 7  |
| 1.2.5. Regenerationsgewebe                                           | 8  |
| 1.2.6. Gewebe aus Nymphen und adulten Tieren                         | 10 |
| 1.3. Methodik der Kultivierung von Geweben                           | 10 |
| 1.3.1. Sterile Gewinnung der Gewebe                                  | 10 |
| 1.3.2. Aufbereitung der Gewebe                                       | 12 |
| 1.3.2.1. Explantatkulturen                                           | 12 |
| 1.3.2.2. Zellkulturen                                                | 14 |
| 1.3.3. Subkulturen                                                   | 16 |
| 1.3.4. Zell-Linien                                                   | 17 |
| 1.4. Biologie der Arthropodenzellen                                  | 30 |
| 1.4.1. Morphologie                                                   | 30 |
| 1.4.1.1. Primärzellen                                                | 30 |
| 1.4.1.2. Zell-Linien                                                 | 32 |
| 1.4.2. Vermehrung von Zellen                                         | 34 |
| 1.4.3. Kulturbedingungen                                             | 37 |
| 1.4.3.1. Nährstoffbedürfnisse und Stoffwechsel                       | 37 |
| 1.4.3.2. Kulturmedien                                                | 46 |
| 1.4.3.3. Wasserstoffionen-konzentration                              | 58 |

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4.3.4. Osmolarität                                                                           | 58 |
| 1.4.3.5. Bebrütungstemperatur                                                                  | 59 |
| 1.4.3.6. Kulturgefäße                                                                          | 59 |
| 1.5. Zellkonservierung und -lagerung                                                           | 61 |
| 2. <u>Verwendung von Arthropodenzellkulturen für das Studium der Vermehrung animaler Viren</u> | 62 |
| 2.1. Historischer Überblick                                                                    | 62 |
| 2.2. Virusvermehrung in Primärkulturen                                                         | 63 |
| 2.2.1. Virusvermehrung in Insektenkulturen                                                     | 63 |
| 2.2.2. Virusvermehrung in Zeckenzellkulturen                                                   | 64 |
| 2.3. Virusvermehrung in permanenten Zell-Linien                                                | 69 |
| 2.3.1. <i>Antheraea eucalypti</i> -Linie                                                       | 69 |
| 2.3.2. <i>Aedes</i> Zell-Linien                                                                | 71 |
| 2.3.2.1. <i>Aedes aegypti</i>                                                                  | 71 |
| 2.3.2.2. <i>Aedes albopictus</i>                                                               | 75 |
| 2.3.3. <i>Culex quinquefasciatus</i> -Linie                                                    | 78 |
| 2.3.4. <i>Drosophila melanogaster</i> -Linie                                                   | 79 |
| C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN                                                                       | 82 |
| 1. <u>Material und Methoden</u>                                                                | 82 |
| 1.1. Verwendung und Zusammenstellung geeigneter Kulturmedien                                   | 82 |
| 1.1.1. Gewinnung von Hämolymphe                                                                | 82 |
| 1.1.2. Analysen von Hämolymphe                                                                 | 83 |
| 1.1.2.1. Kationen und Anionen                                                                  | 83 |
| 1.1.2.2. Zucker                                                                                | 85 |
| 1.1.2.3. Aminosäuren                                                                           | 85 |
| 1.2. Technik der Kultivierung von Zellen und Geweben in-vitro                                  | 85 |
| 1.2.1. Auswahl der Tiere für die Gewinnung von Geweben                                         | 86 |
| 1.2.1.1. Embryonen                                                                             | 86 |
| 1.2.1.2. Larven                                                                                | 86 |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.2. Präparation der Gewebe                                                       | 87 |
| 1.2.2.1. Embryonen                                                                  | 87 |
| 1.2.2.2. Larven                                                                     | 87 |
| 1.2.3. Aufschließen der Gewebe                                                      | 88 |
| 1.2.3.1. Gewebeexplantation                                                         | 88 |
| 1.2.3.2. Enzymatische Spaltung                                                      | 88 |
| 1.2.4. Kulturgefäße                                                                 | 89 |
| 1.2.5. Primärkulturen                                                               | 89 |
| 1.2.5.1. Explantatkulturen                                                          | 89 |
| 1.2.5.2. Zellkulturen                                                               | 90 |
| 1.2.5.3. Subkultivierung von<br>Primärkulturen                                      | 90 |
| 1.2.6. Bebrütungstemperatur                                                         | 90 |
| 1.2.7. Optische Ausrüstung                                                          | 90 |
| 1.2.8. Histologische Präparate                                                      | 90 |
| 1.2.8.1. Nativpräparate                                                             | 90 |
| 1.2.8.2. Färbepräparate                                                             | 90 |
| 1.3. Infektion von Primärzellkulturen und<br>Insektenzell-Linien mit animalen Viren | 91 |
| 1.3.1. Virusmaterial                                                                | 91 |
| 1.3.2. Zellkulturen                                                                 | 92 |
| 1.3.2.1. Primärzellkulturen                                                         | 92 |
| 1.3.2.2. Zell-Linien                                                                | 92 |
| 1.3.3. Infizierung der Kulturen                                                     | 93 |
| 1.3.3.1. ERA-Virus                                                                  | 93 |
| 1.3.3.2. LCM-Virus                                                                  | 94 |
| 1.3.3.3. Sindbis-Virus, WEE-Virus                                                   | 94 |
| 2. <u>Versuche und Ergebnisse</u>                                                   | 95 |
| 2.1. Entwicklung eines Kulturmediums aus Ana-<br>lysen von Hämolymphe               | 95 |
| 2.1.1. Analysen von Kationen und Anionen                                            | 95 |
| 2.1.2. Analysen von Zucker                                                          | 96 |
| 2.1.3. Analysen von Aminosäuren                                                     | 96 |
| 2.1.4. Zusammenstellung des Kulturmediums                                           | 97 |

|                                                                             | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.2. Gewebekulturen                                                         | 100   |
| 2.2.1. Explantatkulturen                                                    | 100   |
| 2.2.2. Zellkulturen aus embryonalem Gewebe                                  | 103   |
| 2.2.3. Zellkulturen aus Regenerationsgeweben                                | 105   |
| 2.2.4. Zellkultur aus Hämocyten                                             | 106   |
| 2.2.5. Einfluß biologischer Mediumzusätze auf das Zellwachstum              | 110   |
| 2.2.6. Subkultivierung der Primärkulturen                                   | 110   |
| 2.3. Verhalten animaler Viren in Primärzellkulturen und Insektenzell-Linien | 111   |
| 2.3.1. Tollwut-Virus, Stamm ERA                                             | 111   |
| 2.3.2. LCM-Virus                                                            | 116   |
| 2.3.3. Sindbis-Virus, WEE-Virus                                             | 117   |
| III. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE                                             | 119   |
| I. ZUSAMMENFASSUNG                                                          | 128   |
| II. LITERATURVERZEICHNIS                                                    | 130   |

## A. EINLEITUNG

Bei einigen schweren Viruserkrankungen von Mensch und Tier spielen Arthropoden, besonders Insekten und Zecken, eine wichtige Rolle als lebende Vektoren. Über den Verbleib und die Persistenz von sog. "Arthropod-borne" Viren in den Vektoren sind nur wenige Einzelheiten bekannt.

Zur Erforschung dieser Vorgänge hat man in den letzten Jahren auch Arthropodenzellkulturen als in-vitro-Systeme herangezogen.

Allerdings gelang es bisher nur von wenigen Insektenarten, reproduzierbar Zellkulturen zu züchten. Das liegt einmal an dem wegen der Größe der Arthropoden nur beschränkt zur Verfügung stehenden Material, zum anderen an dem Fehlen optimaler Kulturmedien.

Da die in-vitro-Züchtung von Arthropodenzellkulturen erst in ihren Anfängen steht, sind Untersuchungen über Etablierung von Zellkulturen und Entwicklung geeigneter Kulturmedien im Hinblick auf ihre Verwendung für Vermehrung von Viren notwendig.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, zuerst eine kritische Literaturlauswertung über die bisher bekannten Verfahren zur in-vitro-Züchtung von Arthropodenzellkulturen durchzuführen.

Experimentell sollte dann geprüft werden, ob es möglich ist, aus Organen der Schabe *Leucophaea maderae* Fabr. (Blattaria) Zellkulturen herzustellen und in Subkulturen weiterzuzüchten.

Hierfür mußten entsprechende Anzüchtungsverfahren und Nährmedien erarbeitet werden.

Schließlich sollte überprüft werden, ob sich, als Erreger von Zoonosen bekannte Virusarten in Zellkulturen aus *L. m a d e r a e* zur Vermehrung bringen lassen.

## B SCHRIFTTUM

### 1. Die Entwicklung der in-vitro-Kultur aus Arthropodengeweben

#### 1.1. Historischer Überblick

Versuche zur in-vitro-Kultivierung von Geweben und Zellen aus Arthropoden gehen bis 1915 zurück, als GOLDSCHMIDT das Wachstum von Follikelzellen aus Hodengewebe einer Motte in Hämolymphe als Kulturmedium untersuchte. Obgleich er hierbei das Heranreifen von Zellen beobachtete, konnte er noch keine Mitosen feststellen. Zu diesem Zeitpunkt standen die für die in-vitro-Kultivierung von Insektengeweben benutzten Nährmedien nur aus Hämolymphe, oder man benutzte einfache Gemische aus Salzlösungen und Hämolymphe, denen zum Teil noch Zucker als Energiespender zugefügt waren. Im Allgemeinen gestatteten diese Medien weder ein Überleben der Gewebe über einen langen Zeitraum noch ein ausgedehntes Zellwachstum; sie wurden jedoch zum Studium bestimmter Problemstellungen wie über die Mechanismen der Mitose und der Gametogenese mit Erfolg verwendet (LEWIS und ROBERTSON, 1916).

Wie bei der Kultivierung von Vertebraten-Geweben stellte man zunächst von den Insekten Explantatkulturen her. Dabei wurden die Explantatstückchen in Hämolymphe eingebettet und im "Hängenden Tropfen" kultiviert. Das Prinzip dieser Methode geht auf HARRISON (1907) zurück.

Um das Wachstum von Primärzellen von Insekten zu erzielen, sind zahlreiche empirische Versuche unternommen worden, das Kulturmedium zu verbessern. Dazu wurde eine Reihe von Gewebeextrakten als Mediumzusätze getestet, die sowohl von Vertebraten als auch Arthropoden stammten. Obwohl auch Kulturmedien für Vertebraten als Mediengrundlage herangezogen wurden, trat in Bezug auf das Zellwachstum keine grundlegende Verbesserung ein. Es konnte aber ein Überleben des Gewebes für mehrere Wochen (TRAGER, 1935) und ein Zellwachstum für 10 Tage (LÜSCHER, 1947) erzielt werden.

Das lange Überleben der Gewebe gestattete TRAGER (1938) die Verwendung derartiger Kulturen (Imaginalscheiben) von *Aedes aegypti* zur Vermehrung des Western Equine Encephalitis-Virus (WEE).

Fortschritte in der in-vitro-Zellzucht wurden erst sichtbar, als man Kenntnisse von der Zusammensetzung der Hämolymphe für die Zusammenstellung von Kulturmedien anwandte. 1956 analysierten WYATT, LOUGHHEED und WYATT die Hämolymphe von *Bombyx mori* und entwickelten auf dieser Grundlage ein Nährmedium, mit dem sich explantierte Ovarien vier Wochen kultivieren ließen, unter ständigem Zellwachstum für zwei Wochen (WYATT, 1956). Das Medium setzte sich aus anorganischen Salzen, organischen Säuren, Aminosäuren und Zuckern zusammen. Vervollständigt wurde es durch Zugabe von 10% hitzeinaktivierter *Bombyx mori*-Hämolymphe.

GRACE (1958) modifizierte WYATT's Medium durch Zugabe von Bestandteilen des Vitamin-B-Komplexes, von Cholesterin und Natriumhydrogenkarbonat. Darüber hinaus wurde die Elektrolytzusammensetzung geändert und der Anteil der Hämolymphe auf 5% verringert. Mit diesem Medium gelang es GRACE, vier Zell-Linien aus Ovarien der Seidenspinner-raupe *Antheraea eucalypti* zu entwickeln, denen zusammen mit Kulturen aus Larven der Gelbfiebertmücke *Aedes aegypti* die ersten Dauerezell-Linien aus Geweben von Arthropoden folgten (GRACE, 1962; 1966).

Die Kultivierung von Zeckengewebe (*Ixodidae*) dagegen ist bis heute mit großen Schwierigkeiten verbunden. Das Hauptproblem liegt wie bei den Insekten in der Zusammenstellung eines geeigneten Kulturmediums. Eine begrenzte Zellvermehrung und das Überleben der Gewebe für mehrere Monate

konnte auf der Grundlage von Medien, die in der Zellkultur von Vertebratengeweben Anwendung finden, erreicht werden. Dabei haben sich Gemische aus Säugetier- und Insektenzellkulturmedien bewährt (REHACEK, 1958; 1962; 1965 a; VAGO und CHASTANG, 1960; MARTIN und VIDLER, 1962; YUNKER und CORY, 1967). Das von REHACEK und BRZOSTOWSKI (1969 a) aus Analysen der Hämolymphe von *Boophilus microplus* entwickelte Kulturmedium scheint bisher das beste Zellwachstum zu ermöglichen, dennoch ist bis heute die Entwicklung einer permanenten Zell-Linie nicht gelungen.

Von Zecken eignen sich für die Kultivierung vorzugsweise Gewebe von Nymphen und adulten Tieren. Die von den Tieren gewonnenen Gewebe können als Explantate in Kulturgefäße überführt werden. Das Festsetzen der Gewebestückchen erfolgt nach leichtem Antrocknen an die Glasunterlage (MARTIN und VIDLER, 1962).

## 1.2. Auswahl von Geweben für die Kultivierung in vitro

Die von GRACE (1962; 1966) entwickelten Dauerzell-Linien sind aus Primärkulturen von Puppenovarien (*Antheraea eucalypti*) und aus Geweben von Larven (*Bombyx mori*) entstanden. Neben diesen Geweben lassen sich für die Zellkultur mit Erfolg Gewebe von Embryonen, Nymphen, ganzen Puppen, Ovarien von adulten Tieren sowie Hämocyten verwenden. Eine gut zu kultivierende Gewebeart stellt das Regenerationsgewebe von Insekten dar.

### 1.2.1. Ovarien

Die Eignung von Ovarien für die Gewebe- und Zellkultur ist durch die Entwicklung einer Reihe von permanenten Zell-Linien eindrucksvoll demonstriert worden (Tabelle 1).

Ovarien lassen sich von *L e p i d o p t e r a* und *D i p t e r a* gewinnen, sowohl von Larven (VAGO und CHASTANG, 1958) und Puppen (GRACE, 1962), als auch von adulten Weibchen (HINK, 1970; HSU et al., 1970; KITAMURA, 1964; 1970). Bei explantierten Ovarien wachsen nach etwa 12 Tagen Zellen aus dem Gewebe aus, die sich nach weiteren 7 Tagen subkultivieren lassen (HSU, 1971). Demgegenüber berichtete GRACE (1962), daß nach Behandlung mit 0,25%igem Trypsin erhaltene Zellen aus Ovarien von *A n t h e r a e a e u c a l y p t i* sich zwar am Boden des Kulturgefäßes festsetzten, daß sie aber bis zu ihrer Proliferation 10 Monate benötigten.

#### 1.2.2. Larvaes und embryonales Gewebe

Der Gebrauch von Embryonen und frisch geschlüpften Larven für die Zellkultur hat sich als recht ergiebig erwiesen. Die Technik für die sterile Gewinnung der Gewebe und deren weitere Bearbeitung ist von MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1963; 1964) für *H o m o p t e r a*, von HORIKAWA und FOX (1964) für *D i p t e r a*, von LANDUREAU (1966) für *O r t h o p t e r a* und von HINK und ELLIS (1971) für *L e p i d o p t e r a* beschrieben worden. Primärkulturen können durch Gewebeexplantate oder durch Aussäen von Zellen nach enzymatischer Spaltung der Gewebe angezüchtet werden.

HINK und ELLIS (1971) zerzupften Embryonen von *C a r - p o c a p s a p o m o n e l l a* mit Nadeln, suspendierten die Gewebefragmente in Kulturmedien und überführten je 5 ml Gewebesuspension in Plastikkulturflaschen. Obgleich sich die Gewebestückchen nicht am Boden des Kulturgefäßes festsetzten, wuchsen nach einem Monat Zellen aus den im Medium schwimmenden Fragmenten aus. Diese Zellen setzten sich am Boden fest, vermehrten sich und konnten nach 2 Monaten subkultiviert werden.

Aus diesen Gewebearten sind in sehr vielen Fällen permanente Zell-Linien entwickelt worden und sie stellen eines der am besten geeigneten Gewebearten für die in-vitro-Kultur dar.

### 1.2.3. Gewebe aus Puppen

SWEET und DUPREE (1968) sowie SHINEDLING und GREENBERG (1971) beschrieben die Verwendung von *D i p t e r a*-Puppen für die Zellzüchtung. Der Inhalt der Puppen wurde aus einer Einschnittöffnung in das Kulturmedium gepresst, dort suspendiert und dann in Kulturflaschen pipettiert. Innerhalb von 6 Stunden setzten sich die Zellen an der Glasunterlage fest, blieben jedoch nicht nebeneinander liegen, sondern lagerten sich zu Aggregaten zusammen, aus denen Zellen wieder herauswanderten und sich vermehrten. Nach 3 bis 5 Tagen wuchsen die Zellen zu Einschichtzellkulturen aus. Von diesem Stadium an begannen die Zellen wieder langsam zu degenerieren, obgleich noch nach 8 Wochen mitotische Aktivität beobachtet werden konnte (SHINEDLING und GREENBERG, 1971).

### 1.2.4. Hämocyten

Die Kultivierung von Hämocyten aus *L e p i d o p t e r a* ist schon 1917 von GLASER vorgenommen worden. Er konnte die Hämocyten von *L y m a n t r i a d i s p a r* im "Hängenden Tropfen" von Hämolymphe 17 Wochen lang am Leben erhalten. Später ist von einer Reihe verschiedener Insektenarten die Kultivierung von Hämocyten *in vitro* beschrieben worden: für *O r t h o p t e r a* von TAYLOR (1935) aus *P e r i p l a n e t a a m e r i c a n a*, für *D i p t e r a* von FISCHER und GOTTSCHESKI (1939) sowie HORIKAWA und KURODA (1959) aus *D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r*, für *D e r m a p t e r a* von ARVY und GABE (1946) aus *F o r f i c u l a a u r i c u l a r i a*

und für Hemiptera von LÜSCHER aus *Rhodnius prolixus*. Nach GLASER (1917) sind Hämocyten weiterer Lepidoptera - Spezies kultiviert worden (WERMEL, 1938; ARNOLD, 1952; CLARK und CHADBOURNE, 1960; ROSENBERGER und JONES, 1960; MARTIGNONI und SCALLION, 1961), bei diesen Untersuchungen gelang jedoch in keinem Fall die Subkultivierung der Zellen.

MITSUHASHI (1966) beschrieb Primärkulturen von Hämocyten aus *Chilo suppressalis*, die länger als 12 Monate am Leben blieben. 7 Monate nach Etablierung der Kultur konnten außerdem Subkulturen durchgeführt werden, denen 1967 die erste permanente Zell-Linie aus Hämocyten folgte. Eine weitere permanente Zell-Linie entwickelten CHAO und BALL (1971) aus Hämocyten von *Samia cynthia*. In beiden Fällen sind die Hämocyten von Lepidoptera -Larven bzw. -Puppen während der Diapause gewonnen worden.

Die Technik zur Gewinnung von Hämocyten scheint einfach, verglichen mit der Technik zur Gewinnung von Zellen aus anderen Insektengeweben. Bein- oder Flügelanlagen der Puppen wurden mit einer sterilen Nadel punktiert und die heraustropfende Hämolymphe wurde in Kulturmedien oder physiologischer Lösung im Kulturgefäß aufgefangen. Die meisten Hämocyten setzten sich schon nach wenigen Minuten an der Unterlage des Kulturgefäßes fest. Danach wurden durch mehrmaliges Waschen der Lösungen sowohl Klumpen von aggregierten Zellen als auch toxische Hämolymphteile, wie Polyphenoloxidase, entfernt. Innerhalb einer Woche nach Einsaat begann ein Teil der Hämocyten mit der Vermehrung (MITSUHASHI, 1966).

#### 1.2.5. Regenerationsgewebe

Hierbei wird für die in-vitro-Kultur die Fähigkeit von Insekten während der Jugendstadien ausgenutzt, verloren-

gegangene Extremitäten wieder vollständig zu regenerieren. Man erhält somit ein Gewebe mit hoher mitotischer Aktivität. NEEDHAM (1952) unterteilte die in-vivo ablaufenden Prozesse in mehrere Abschnitte: Schließen der Wunde, Entfernen von zerstörten Zellen und Differenzierung der Zellen zur Bildung neuer Gewebe für den Reparaturprozess. Es folgen ausbildendes Wachstum und Differenzierung des Regenerates.

O'FARREL und STOCK (1953) zeigten an Beinregeneraten von Larven der Küchenschabe *Blattella germanica*, daß die Ausbildung und Differenzierung des Regenerates vom Häutungszyklus abhängig ist. Wurden die Beine während des letzten Drittels des Zyklus entfernt, schließt sich zwar die Wunde, anstelle des Regenerates wurde aber nur Gewebe von papillenartiger Struktur gebildet. Zur Ausbildung und Differenzierung kam es nur, wenn das Bein zu einem früheren Zeitpunkt entfernt wurde.

Das Wachstum des sich regenerierenden Beines untersuchte BODENSTEIN (1955) im Detail. Wenn das Bein an der Stelle zwischen Trochanter und Femur entfernt wurde, entwickelte sich am proximalen Ende des Stumpfes ein Regenerationsblastem auf Kosten des alten Muskelgewebes, das schließlich zu einem neuen Bein ausgebildet und bei der nächsten Häutung freigelegt wurde. Die Verwendbarkeit von Beinregeneraten von *Blattaria* für die Kultivierung in vitro ist von MARKS und REINECKE (1964) bei *Leucophaea maderae* demonstriert worden. Dabei wurden die beiden Mesothoraxbeine von Larven im 5. Larvenstadium 2 Tage nach der Häutung an der Stelle zwischen Trochanter und Femur abgetrennt. Nach 10 bis 21 Tage dauernder Regenerationszeit konnten dann die Beinregenerate aus den Coxen herauspräpariert und explantiert werden. Nach 5 - 8 Tagen wuchsen Zellen und Vesikel, die als sphärische Gebilde von miteinander verbundenen schmalen, epithelartigen Zellen in Erscheinung treten, von den explantierten Regeneraten aus.

### 1.2.6. Gewebe aus Nymphen und adulten Tieren

Sowohl von Insekten als auch Zecken können Nymphen und adulte Tiere für Kulturen herangezogen werden.

MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1964) verwendeten erfolgreich die Gewebe aus Nymphen von H o m o p t e r a. Daneben konnten sie ebenfalls von explantiertem imaginalen Gewebe Zellwachstum erhalten, wenn sie adulte Tiere bis zu 10 Tage nach der letzten Häutung verwendeten.

Für Zellkulturen aus entsprechenden Zeckengeweben haben MARTIN und VIDLER (1962) eine brauchbare Technik entwickelt. Die Nymphen und adulten Tiere werden zunächst mit 70%igem Äthanol behandelt und dann in eine Petrischale mit flüssigem Wachs zum Teil eingetaucht. Nach dem Festwerden des Wachses sind die Tiere bewegungsunfähig und können mit sterilen Instrumenten unter dem Präparationsmikroskop geöffnet werden. Der gesamte Körperinhalt der Zecken wird herauspräpariert und in Kulturfäße explantiert. Nachdem das Gewebe leicht auf der Glasunterlage angetrocknet und damit fixiert ist, wird das Kulturmedium zugegeben.

REHACEK (1965 a) benutzte anstelle der Explantat-Technik Trypsin mit Erfolg zur Gewinnung von Primärzellen. Schon nach 3 bis 5 Tagen wuchs nach Teilung der Zellen eine Einschichtzellkultur aus und mitotische Aktivität war noch 10 Tage nach Zelleinsaat zu beobachten.

### 1.3. Methodik der Kultivierung von Geweben

#### 1.3.1. Sterile Gewinnung der Gewebe

Für Insekteneier ist mit Erfolg 0,5 - 3%ige Natriumhypochlorit-Lösung ( $\text{NaOCl}$ ) zur Sterilisierung allein oder in Kombination mit Äthanol verwendet worden (LESSEPS, 1965; KURODA, 1969; HINK und ELLIS, 1971). HORIKAWA und FOX (1964) benutzten eine 3%ige  $\text{NaOCl}$ -Lösung für 2 Minuten zur Sterilisierung von D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r-Eiern. Bei dieser Behandlung wird außerdem das Chorion der

Eier entfernt. Anschließend wurden die Eier mit Aqua bidest. gewaschen und 15 Minuten lang mit einer Lösung von 0,05%igem Quecksilberchlorid in 70%igem Äthanol behandelt. Danach folgte dreimaliges Waschen in Kulturmedium.

Anstelle von NaOCl kann auch 1%ige Kupfersulfatlösung verwendet werden. PELEG (1968 a) behandelte damit Eier von *Aedes aegypti* 7 Minuten lang, die anschließend mit 0,5%iger Quecksilberchloridlösung in 70%igem Äthanol sterilisiert wurden. Danach folgten 6 Waschungen in sterilem Wasser und eine Waschung in Kulturmedium. Bei dieser Art der Sterilisierung der Eier treten keine Schädigungen an den Geweben der Embryonen auf.

Die Sterilisierung von Nymphen oder adulten Tieren erfolgt vor dem Herauspräparieren der Gewebe mit 70%igem Äthanol. Die Behandlungsdauer richtet sich nach der Empfindlichkeit der äußeren Hüllen der Tiere als Schutz für das darunterliegende Gewebe. Sie reicht von 5 Sekunden bei *Homoptera* (TOKUMITSU und MARAMOROSCH, 1966) bis zu 20-40 Minuten bei *Diptera* (SCHNEIDER, 1971). VAGO und FLANDRE (1963) verwendeten wegen der Empfindlichkeit von *Homoptera* - Nymphen und adulten Tieren eine Folge von 5 Waschlösungen mit den Antibiotika-Zusätzen Bacitracin (5 IE/ml), Colimycin (25 µg/ml), Penicillin (200 IE/ml), Streptomycin (0,05 mg/ml), Chloramphenicol (5-10 µg/ml) sowie Mykostatin für die herauspräparierten Gewebe erfolgreich.

HIRUMI und MARAMOROSCH (1963) benutzten für die Sterilisierung von *Homoptera* - Nymphen und -adulten Tieren eine 0,1% Hyamin-2389<sup>(R)</sup>-Lösung (3 Minuten) mit nachfolgenden Waschungen in sterilem Aqua dest. und physiologischer Salzlösung. Allgemein hat sich der Gebrauch von 0,1 - 0,2%iger Hyamin-Lösung, insbesondere Hyamin-1622<sup>(R)</sup> allein (VAUGHN und STANLEY, 1970; KURRTI und BROOKS, 1970) oder in Kombination mit Äthanol (EIDE und CHANG, 1969) bewährt.

### 1.3.2. Aufbereitung der Gewebe

#### 1.3.2.1. Explantatkulturen

Larven und Ovarien können nach der Sterilisierung in steriler physiologischer Lösung in kleine Stückchen geschnitten werden. Embryonen und Eier lassen sich mit Präpariernadeln zerzupfen (KITAMURA, 1964; HINK und ELLIS, 1971). PELEG (1968 a) zerdrückte Eier und damit Embryonen von *Aedes aegypti* leicht mit einem Glasstab und preßte die Gewebestückchen durch ein Stahlgitternetz, das am Boden eines Stahlhomogenisators angebracht war. Der so gewonnene Gewebebrei wurde in einem Zentrifugenglas gesammelt und, nachdem Reste der Eischalen sich am Boden abgesetzt hatten, wurde der Überstand bei 800 Upm für 3 Minuten zentrifugiert. Die sedimentierten Gewebefragmente und Zellen sind dann in Kulturmedium gewaschen und in Kulturgefäße eingesät worden. Nach 8 bis 10 Tagen sind um die ursprünglichen Gewebestückchen eine große Anzahl von Zellen gewachsen und von Einzelzellen ausgehend haben sich Kolonien gebildet.

SCHNEIDER (1969) zerkleinerte die Gewebe enzymatisch mit Trypsin bei Zimmertemperatur, ohne daß Gewebestückchen geschädigt oder Zellen in ihrer mitotischen Aktivität beeinträchtigt wurden. 200 *Anopheles stephensi* - Larven im 1. Larvenstadium wurden für je eine T-30-Kulturflasche benötigt. Die Trypsinierung erfolgte nach folgendem Verfahren: Larven wurden auf einem eingeschliffenen Objektträger in eine Lösung aus 2%igem Trypsin in RINALDINI's (1954) Salzlösung gebracht und dort zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden dann in frische Trypsinlösung überführt und 45 Minuten lang der Enzymwirkung ausgesetzt. Nach Zugabe von fötalem Kälberserum (FBS) schloss sich die Zentrifugation der Zell-Gewebe-Suspension an, anschließend erfolgte Resuspension des Sedimentes in 1 ml und nach Zugabe von weiteren 3 ml Nährmedium wurden die Zellen in das Kulturgefäß eingesät. Von den explantierten Geweben wanderten innerhalb von wenigen Tagen sphärische Zellen und Vesikel aus. Eine Standard-

methode für Explantatkulturen von Embryonen, Nymphen und adulten Tieren ist von MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1964) für H o m o p t e r a angegeben worden: Nach Behandlung mit 70%igem Äthanol und darauffolgendem Waschen in sterilem Aqua dest. wurden die Tiere in kleine Stückchen geschnitten und für 15 Minuten mit 0,25%iger Trypsinlösung bei Zimmertemperatur behandelt, ohne daß die Gewebestückchen bewegt wurden. Damit wurde die Klumpenbildung und Ausbildung viskoser, gelartiger Gewebeverbände umgangen. Durch die Trypsinbehandlung der Gewebefragmente soll das spätere Auswachsen der Zellen aus den Explantaten unterstützt werden. Die beobachtete Wirkung ist möglicherweise mit der schonenden Entfernung der Basalmembranen zu erklären, die die meisten Organe fest umgeben. Dadurch können Zellen nicht nur von den Schnittstellen, sondern auch von anderen Zonen des Gewebestückchens auswachsen.

Die Einwirkung von Trypsin ist jedoch keine unbedingte Voraussetzung für das Auswachsen der Zellen aus den Explantaten: auch ohne Trypsinierung wachsen Zellen aus, was von MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1964) in einem Parallelkulturansatz sowie anderen Autoren gezeigt werden konnte (CHIU et al., 1966; CHIU und BLACK, 1967; TOKUMITSU und MARAMOROSCH, 1967).

Nach Überführung der trypsinierten Gewebestückchen in Kulturgefäße setzten sie sich sofort an der Glasunterlage fest. 24 Stunden nach Einsaat war bereits ein Auswachsen von Zellen aus den Gewebestückchen zu beobachten. Auf diese Weise gewonnene Kulturen sind über 5 Monate bei wöchentlichem Mediumwechsel unter Zellwachstum am Leben erhalten worden (HIRUMI und MARAMOROSCH, 1968).

### 1.3.2.2. Zellkulturen

HORIKAWA und FOX (1964) beschrieben eine mechanische Methode, bei der Embryonen aus Eiern von *Drosophila melanogaster* durch Homogenisieren zerkleinert werden. Die sterilisierten Eier wurden zusammen mit 1 ml Kulturmedium in einen 2 ml-Glashomogenisator (Potter) gefüllt und durch leichtes, langsames Zerstoßen in Einzelzellen und Gewebefragmente dissoziiert. Diese Methode war zellschonend, da nur ein geringer Anteil von zerstörten Zellen auftrat. Danach wurde das Homogenisat durch ein gesintertes Glasfilter mit der Porenweite von 170-200  $\mu$  filtriert, um zerstörte Gewebefragmente abzutrennen. Nach Zugabe von 15 ml Medium zusammen mit 10% Kälberserum zum Filtrat wurde die Zellsuspension in T-30 Kulturflaschen zu je 5 ml abgefüllt und bei  $+30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Innerhalb von 2 Tagen erfolgte eine Verdoppelung der Zellzahl.

Als proteolytisches Enzym zur Spaltung von Gewebe in Einzelzellen hat sich, bei Vertebraten routinemäßig, Trypsin bewährt. Bei der Spaltung von Geweben aus Insekten sind Enzyme jedoch nicht uneingeschränkt verwendbar. DAY und GRACE (1959) sowie JONES (1962) berichteten über eine toxische Wirkung von Trypsin, jedoch erhielt GRACE (1962) bei der Behandlung von *Antheraea eucalypti* - Ovarien mit 0,25%iger Trypsinlösung auch gesunde, teilungsfähige Zellen.

GRACE (1963) testete die Enzyme Hyaluronidase, Papain, Pankreatin, Lysozym, Trypsin und als Chelatbildner Äthylen-diamintetraessigsäure (EDTA) auf ihre Fähigkeit, Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen, ohne sie zu zerstören, und blieb zunächst erfolglos. Erst, als er 0,25% Trypsin in Puck's Saline A bei  $+37^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten auf die Gewebe einwirken ließ, erhielt er unbeschädigte, teilungsfähige Zellen (GRACE, 1963), aus denen er 1962 3 von 4 permanenten

Zell-Linien aus Ovarien von *Antheraea eucalypti* entwickelte.

LANDUREAU (1966) verwendete mit Erfolg Trypsinkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5% beim Aufschließen von Geweben verschiedener *Blattaria*-Embryonen. Bei einer Temperatur von  $+37^{\circ}\text{C}$  wirkte die Trypsinlösung 15-20 Minuten auf das Gewebe ein, wobei nach 5 Minuten die Trypsin-Lösung erneuert wurde. Nach schonendem Abzentrifugieren wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, suspendiert und in Kulturgefäße eingesät.

Anstelle von Trypsin ist für das Aufschließen der Gewebe Pronase auf seine Eignung untersucht worden (VARMA und PUDNEY, 1967). Die Autoren erhielten mit einer 0,1%igen Pronase-Lösung beim Aufschluss von embryonalen Geweben von *Triatoma maculata* bessere Ergebnisse als mit 0,25%iger Trypsin-Lösung.

Der Gebrauch von EDTA für die Dissoziierung von Geweben in Einzelzellen ist beschrieben worden (GRACE, 1963; LESSEPS, 1965), hat sich jedoch ebenso wie die Verwendung von Pronase nicht durchsetzen können.

Zelleinsaatmengen von mindestens  $1-2 \times 10^5/\text{ml}$  Kulturmedium scheinen zur Ausbildung einer Einschichtzellkultur ausreichend zu sein. EIDE und CHANG (1969) konnten bei dieser Zellkonzentration von *Musca domestica* nach 30-40 Tagen eine große Anzahl von Klon-ähnlich wachsenden Zellkolonien beobachten, die dann subkultiviert werden konnten. Insgesamt scheint die Änderung der Zelleinsaatkonzentration für das Wachstum der Zellen zu Einschichtzellkulturen nicht kritisch zu sein. KURTTI und BROOKS (1970) benutzten bei der Kultivierung von *Lepidoptera*-Hämocyten Zelleinsaatkonzentrationen von  $10^5-10^6/\text{ml}$  mit gleich guten Wachstumsergebnissen, während erst Kulturen mit einer Zellzahl von kleiner als  $10^4/\text{ml}$  nicht lange überlebten.

### 1.3.3. Subkulturen

Bei der Überführung von bereits in-vitro gezüchteten Zellen von einem Kulturgefäß in ein neues erhält man Subkulturen. Die Teilungsrate liegt bei der Subkultivierung von Arthropoden-Primärzellen nicht höher als 1:2. Die Zellen lassen sich sowohl mechanisch mit einem Gummischaber oder mit Nadeln als auch durch Einwirkung von 0,1%iger Trypsin-Lösung für 10 Minuten bei  $25^{\circ}\text{C}$  von der Glasunterlage ablösen. MITSUHASHI (1966) benutzte bei Chilo suppressalis beide Methoden mit gleich gutem Erfolg nebeneinander.

MAZZONE (1971) kultivierte Hämocyten von Lymantria dispar (Lepidoptera). Bei dem Versuch, die Zellen enzymatisch von der Glasunterlage abzulösen, wurden die Zellen jedoch irreparabel geschädigt; sowohl durch den Gebrauch von Trypsin (0,25%) und Trypsin-EDTA (0,25% - 0,1%) als auch durch Pronase (0,25%). Subkulturen gelangen aber nach Ablösung der Zellen auf mechanischem Wege: die auf einem Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden in eine Petrischale gepflanzt, so daß sie zwischen Deckgläschen und Glasunterlage der Petrischale zu liegen kamen. Nach Zugabe von Nährmedium streckten sich die Zellen vom Deckgläschen aus, hefteten sich am Boden der Petrischale fest und vermehrten sich hier.

Pronase ist für die Verwendbarkeit bei Subkulturen von SCHNEIDER (1969) getestet worden. Der Autor stellte fest, daß es im Vergleich mit Trypsin besser für die Zellablösung war. Bei einer Konzentration von 0,01% gegenüber 0,25% von Trypsin scheint sich Pronase jedoch nachteilig auf die Zellmorphologie auszuwirken: die behandelten Zellen wuchsen langgestreckter, was als mögliche Alteration der Zellen interpretiert wurde.

Für die Durchführung von Subkulturen läßt sich bei Primärkulturen von Arthropodenzellen kein genereller Zeitpunkt angeben. Gute Erfolge sind von Kulturen erzielt worden, in denen die Zellen noch gute mitotische Aktivität zeigten bzw. nach einer Ruhepause sich wieder zu teilen begannen.

HSU (1971) konnte Primärzellen von *Culex quinquefasciatus* schon nach 3 Wochen subkultivieren während bei *Chilo suppressalis* erst nach 6 Monaten Subkulturen durchgeführt werden konnten (MITSUHASHI, 1967 a).

Nach der Subkultivierung kann die Vermehrung entweder von einem Teil der Zellen, von der ganzen Zellpopulation oder von bestimmten Zelltypen ausgehen (SINGH, 1967; SCHNEIDER 1969; 1971). Primärzellen, die in Suspension wachsen, können für die Subkultivierung herangezogen werden. CHAO und BALL (1971) erhielten bei Primärkulturen von Hämocyten von *Samia cynthia* - Puppen sowohl Einschichtzellkulturen als auch kleine, runde Zellen, die sich im Nährmedium vermehrten. Während die Subkultivierung der festhaftenden Zellen mißlang, konnten die im Medium schwimmenden Zellen ständig weitervermehrt werden.

#### 1.3.4. Zell-Linien

Wenn Zellpopulationen ständig subkultiviert werden können, entstehen Zell-Linien. Unter permanenten oder Dauerzell-Linien versteht man im allgemeinen Zellpopulationen, die mindestens ein Jahr lang (über 70 mal) subkultiviert worden sind.

Permanente Insektenzell-Linien sind bis heute von etwa 22 Spezies der Ordnungen *Lepidoptera*, *Diptera*, *Homoptera* und *Blattaria* entwickelt worden. Sie wurden von Primärzellkulturen aus Geweben von Ovarien, Embryonen, Larven und von Hämocyten weitergezüchtet. Die Zellen wachsen entweder auf der Kulturgefäßunterlage zu Einschichtzellkulturen aus oder frei bewegliche Zellen vermehren sich im Nährmedium und bilden Suspensionskulturen. Auch Mischkulturen beider Wachstumsformen können beobachtet werden.

Tabelle 1: Übersicht über bisher entwickelte Insektenzell-Linien

LEPIDOPTERA

|                             |                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Antheraea eucalypti</u>                                                                                                                                                                                                               |
| Ausgangsgewebe              | Ovarien von Puppen, trypsiniert                                                                                                                                                                                                          |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml<br>Medium                                                                                                                                                                            |
| Populationsverdopplungszeit | 36-72 h                                                                                                                                                                                                                                  |
| Subkulturintervall          | 7-10 Tage                                                                                                                                                                                                                                |
| Zell-Charakteristika        | 3 verschiedene Zelltypen: 1. polygonal mit fein granuliertem Zytoplasma, 20-40 $\mu$ Durchmesser. 2. fibroblastenartig mit 15-20 $\mu$ Durchmesser. 3. klein und rund mit 10-15 $\mu$ Durchmesser, Chromosomenzahl zwischen 2n und 128n. |
| Kulturmedium                | GMA + 5% <u>A. eucalypti</u> -Hämolymphe                                                                                                                                                                                                 |
| Autor                       | GRACE, 1962                                                                                                                                                                                                                              |

-----

|                             |                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Bombyx mori</u>                                                                                                                                                                       |
| Ausgangsgewebe              | Ovarien von Larven, trypsiniert                                                                                                                                                          |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml<br>Medium                                                                                                                                   |
| Populationsverdopplungszeit | 48 h                                                                                                                                                                                     |
| Subkulturintervall          | 6 Tage                                                                                                                                                                                   |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend spindelförmiger Zelltyp mit 12-25 $\mu$ Breite und 50-70 $\mu$ Länge; andere Zellen sind spindelförmig mit 18-30 $\mu$ Durchmesser und enthalten mehr als 100 Chromosomen. |
| Kulturmedium                | GMA + 5% <u>A. eucalypti</u> -Hämolymphe<br>GMA + 1% <u>A. eucalypti</u> -Hämolymphe +<br>1% BSA                                                                                         |
| Autor                       | GRACE, 1967                                                                                                                                                                              |

Fortsetzung Tabelle 1 LEPIDOPTERA

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Carpocapsa pomonella</u> , CP 1268                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur und Wachstum in Suspension, max. $1 \times 10^7$ Zellen/ml Medium                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Populationsverdopplungszeit | 24 h                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Zell-Charakteristika        | 3 Zelltypen: 61% sind spindelförmig mit einer Breite von $9,4 - 15,9 \mu$ und $25,5 - 47,6 \mu$ Länge; 23% sind sphärisch mit einem Durchmesser zwischen $12,9 \mu$ und $19,3 \mu$ und 15% sind einfach gestreckte Zellen mit Abmessungen von $8,6 - 10,1 \times 24,2 - 34,6 \mu$ . Chromosamenzahl liegt zwischen 50 und 195, wobei 51% zwischen 51 und 57 Chromosomen und 35% zwischen 102 und 110 Chromosomen enthalten; $2n = 54$ . |
| Kulturmedium                | TNM - FH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Autor                       | HINK und ELLIS, 1971                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

---

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Carpocapsa pomonella</u> , CP 169                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur und Wachstum in Suspension, max. $5 \times 10^6$ Zellen/ml Medium                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Populationsverdopplungszeit | 24 h                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Zell-Charakteristika        | 3 Zelltypen: 70% sind sphärisch mit einem Durchmesser zwischen $11,0 - 20,2 \mu$ ; 22% sind einfach gestreckte Zellen mit Abmessungen von $11,0 - 15,9 \times 18,9 - 40,0 \mu$ ; 7% sind spindelförmig mit einer Breite von $10,1 - 13,1 \mu$ und einer Länge von $26,5 - 31,3 \mu$ . Zellen sind stark heteroploid, wobei 72% mehr als 100 Chromosomen enthalten und 9% diploid sind. |
| Kulturmedium                | TNM - FH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Autor                       | HINK und ELLIS, 1971                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

Fortsetzung von Tabelle 1 LEPIDOPTERA

|                             |                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Chilo suppressalis</u>                                                                                                                                                                                                                |
| Ausgangsgewebe              | Hämocyten aus Larven während der Diapause                                                                                                                                                                                                |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                                                                                                                                                                                                     |
| Populationsverdopplungszeit | 108 h                                                                                                                                                                                                                                    |
| Subkulturintervall          | 1 - 2 Wochen                                                                                                                                                                                                                             |
| Zell-Charakteristika        | Zellen leiten sich wahrscheinlich von Prohämocyten ab. Vorherrschend sind sphärische Zellen von 18,2 $\mu$ Durchmesser. Einige sind spindelförmig mit einer Länge von 34,1 $\mu$ . Zellen zufällig mit Chilo Iridescent Virus infiziert. |
| Kulturmedium                | CSM - 2F                                                                                                                                                                                                                                 |
| Autor                       | MITSUHASHI, 1967                                                                                                                                                                                                                         |

-----

|                             |                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Heliothis Zea</u> , IMC-HZ-1                                                                                                                                                        |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Ovarien von adulten Weibchen                                                                                                                                              |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. 1 - 2 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml Medium                                                                                                                              |
| Populationsverdopplungszeit | 33 h                                                                                                                                                                                   |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                                                                                                                                 |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend sphärisch bis ellipsoide Zellen (90%) von 9,9 - 26,2 $\mu$ Durchmesser; 6% haben Protoplasmaauswüchse und 4% sind gestreckte, 2-kernige Zellen. Zellen sind heteroploid. |
| Kulturmedium                | Modifiziertes YUNKER, VAUGHN und CORY (1967)-Medium, bezeichnet IMC-1                                                                                                                  |
| Autor                       | HINK und IGNOFFO, 1970                                                                                                                                                                 |

Fortsetzung von Tabelle 1 LEPIDOPTERA

|                             |                                                                                                        |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Samia cynthia</u>                                                                                   |
| Ausgangsgewebe              | Hämocyten von Puppen, spätes Stadium der Diapause                                                      |
| Art des Wachstums           | Suspension                                                                                             |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                                                                      |
| Subkulturintervall          | 14 Tage                                                                                                |
| Zell-Charakteristika        | Kleine runde Zellen mit einem Durchmesser von 13-24 $\mu$ . Zellen sind tetraploid mit 52 Chromosomen. |
| Kulturmedium                | GMA + 10% FBS                                                                                          |
| Autor                       | CHAO und BALL, 1971                                                                                    |

|                             |                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Trichoplusia ni</u>                                                                                                                                                                              |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Ovarien von adulten Weibchen                                                                                                                                                           |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur oder Wachstum in Suspension, max. $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml Medium                                                                                                           |
| Populationsverdopplungszeit | 16 h                                                                                                                                                                                                |
| Subkulturintervall          | 2 - 3 Tage                                                                                                                                                                                          |
| Zell-Charakteristika        | Zellen sind rund bis oval mit einem Durchmesser zwischen 9 $\mu$ und 95 $\mu$ und weisen z.T. Protoplasmaauswüchse von bis zu 105 $\mu$ Länge auf. 90% enthalten 82-95 Chromosomen, einige 160-180. |
| Kulturmedium                | TNM-FH                                                                                                                                                                                              |
| Autor                       | HINK, 1970                                                                                                                                                                                          |

Fortsetzung Tabelle 1

D I P T E R A

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes aegypti</u>                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven vom 1. Larvenstadium                                                                                                                                                                                                                                  |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur + Wachstum in Suspension                                                                                                                                                                                                                             |
| Populationsverdopplungszeit | 51 h                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Subkulturintervall          | 7 - 10 Tage                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend spindelförmige Zellen von 8 - 10 $\mu$ Breite und 40 - 50 $\mu$ Länge; andere sind rund mit einem Durchmesser von 20 $\mu$ oder 55 - 60 $\mu$ . Die meisten Zellen enthalten 96 Chromosomen (32n), am Zweithäufigsten treten Zellen mit 38 Chromosomen auf. |
| Kulturmedium                | GMA + 5% <u>A. eucalypti</u> -Hämolymphe                                                                                                                                                                                                                                  |
| Autor                       | GRACE, 1966                                                                                                                                                                                                                                                               |

-----

|                             |                                    |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes aegypti</u>               |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven, trypsiniert   |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur               |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                  |
| Subkulturintervall          | 7 - 14 Tage                        |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend epithelartige Zellen |
| Kulturmedium                | M-M-Medium                         |
| Autor                       | SINGH, 1967                        |

Fortsetzung von Tabelle 1 DIPTERA

|                             |                                                                                      |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes aegypti</u>                                                                 |
| Ausgangsgewebe              | Homogenisierte Embryonen                                                             |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur in diskontinuierlicher Verteilung (Aggregatbildung), Suspension |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                                                    |
| Subkulturintervall          | 4 - 6 Tage                                                                           |
| Zell-Charakteristika        | Zellen in verschiedenen Formen und Größen nebeneinander; Vesikelartige Gebilde       |
| Kulturmedium                | 80% KITAMURA's (1966) Medium, 10% FBS, 10% "Conditioned medium", 1% CEE              |
| Autor                       | PELEG, 1969 b                                                                        |

---

|                             |                                                                                                              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes aegypti</u>                                                                                         |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven, trypsiniert                                                                             |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur, Vesikel                                                                                |
| Populationsverdopplungszeit | 29 h                                                                                                         |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                                                       |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend fibroblastenartige Zellen, andere epithelartig. Die meisten Zellen sind diploid mit $2n = 6$ . |
| Kulturmedium                | M-M Medium oder modifiziertes KITAMURA (1966) Medium                                                         |
| Autor                       | VARMA und PUDNEY, 1969                                                                                       |

Fortsetzung von Tabelle 1 DIPTERA

|                             |                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes albopictus</u>                                                                                                                                                                                  |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven, trypsiniert                                                                                                                                                                         |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                                                                                                                                                                     |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                                                                                                                                                                        |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                                                                                                                                                   |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschender Zelltyp ist rund mit einem Durchmesser von 6 - 20 $\mu$ , am Zweithäufigsten sind spindelförmige Zellen mit 7 - 10 $\mu$ Breite und 15 - 90 $\mu$ Länge, ein dritter Typ ist zweikernig. |
| Kulturmedium                | M-M Medium                                                                                                                                                                                               |
| Autor                       | SINGH, 1967                                                                                                                                                                                              |

---

|                             |                                                   |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes vexans</u>                               |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Puppen                               |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                 |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                            |
| Zell-Charakteristika        | Chromosomenzahl liegt zwischen 156 und 216        |
| Kulturmedium                | GMA + 10% FBS                                     |
| Autor                       | SWEET und McHALE, 1970                            |

---

|                             |                                                          |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aedes vittatus</u>                                    |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte, frisch geschlüpfte Larven                  |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                     |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                        |
| Subkulturintervall          | 12 - 14 Tage                                             |
| Zell-Charakteristika        | Zellen sind hauptsächlich diploid, Wachstum von Vesikeln |
| Kulturmedium                | SCHNEIDER's (1969) Medium + 10% FBS                      |
| Autor                       | BHAT und SINGH, 1970                                     |

Fortsetzung von Tabelle 1 DIPTERA

|                             |                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Anopheles stephensi</u>                                                                                                                                       |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven vom 1. Larvenstadium, trypsiniert                                                                                                            |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                                                                                                                             |
| Populationsverdopplungszeit | 65 h                                                                                                                                                             |
| Subkulturintervall          | ?                                                                                                                                                                |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend sind epithelartige Zellen mit einem Durchmesser von 4 - 9 $\mu$ und einer Länge von 12 - 20 $\mu$ . Die meisten Zellen sind diploid mit $2n = 6$ . |
| Kulturmedium                | SCHNEIDER's (1969) Medium                                                                                                                                        |
| Autor                       | SCHNEIDER, 1969                                                                                                                                                  |

|                             |                                                                   |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Anopheles stephensi</u>                                        |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Larven vom 1. Larvenstadium, trypsiniert             |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $8 \times 10^6$ Zellen/ml Medium                 |
| Populationsverdopplungszeit | 16 h                                                              |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                            |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend sind fibroblastenartige, diploide Zellen            |
| Kulturmedium                | Modifiziertes KITAMURA (1966) Medium mit VP <sub>12</sub> -Medium |
| Autor                       | PUDNEY und VARMA, 1971                                            |

|                             |                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Culex molestus</u>                               |
| Ausgangsgewebe              | Adulte Ovarien                                      |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $1,1 \times 10^6$ Zellen/ml Medium |
| Populationsverdopplungszeit | 30 h                                                |
| Subkulturintervall          | 2 Subkulturen pro Woche                             |
| Zell-Charakteristika        | Die meisten Zellen sind diploid                     |
| Kulturmedium                | KITAMURA's (1970) Medium                            |

Fortsetzung von Tabelle 1 DIPTERA

|                             |                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Culex quinquefasciatus</u>                                                                                                                                                                             |
| Ausgangsgewebe              | Adulte Ovarien                                                                                                                                                                                            |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                                                                                                                                                                      |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                                                                                                                                                                         |
| Subkulturintervall          | 3 - 4 Tage                                                                                                                                                                                                |
| Zell-Charakteristika        | 2 epithelartige Zelltypen: vorherrschend spindelförmig mit den Abmessungen $12,9 \times 21,5 \mu$ und runde Zellen mit einem Durchmesser von $12,1 \mu$ mit granuliertem Cytoplasma; Zellen sind diploid. |
| Kulturmedium                | 7 2 1 Medium                                                                                                                                                                                              |
| Autor                       | HSU, 1971                                                                                                                                                                                                 |

---

|                             |                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Culiseta inornata</u>                            |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte adulte Tiere                           |
| Art des Wachstums           | Suspension, max. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml Medium |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                   |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                              |
| Zell-Charakteristika        | Extrem polyploid mit 50 - 70n                       |
| Kulturmedium                | GMA + 10% FBS                                       |
| Autor                       | SWEET und McHALE, 1970                              |

---

|                             |                                                                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Drosophila melanogaster</u>                                                      |
| Ausgangsgewebe              | Homogenisierte Embryonen, ca. 12 h alt                                              |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                                                                |
| Populationsverdopplungszeit | 20 h                                                                                |
| Subkulturintervall          | 7 Tage                                                                              |
| Zell-Charakteristika        | Zellen sind klein und rund mit einem Durchmesser von $10 \mu$ ; Zellen sind diploid |
| Kulturmedium                | D - 20                                                                              |
| Autor:                      | ECHALIER und OHANESSIAN, 1970                                                       |

Fortsetzung Tabelle 1

H O M O P T E R A

|                             |                                    |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Aceratagallia sanguinolenta</u> |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen             |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur               |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                  |
| Subkulturintervall          | ?                                  |
| Zell-Charakteristika        | ?                                  |
| Kulturmedium                | CHIU und BLACK's (1967) Medium     |
| Autor                       | CHIU und BLACK, 1969               |

|                             |                                         |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Agallia constricta</u> , AC 20       |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen                  |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur                    |
| Populationsverdopplungszeit | 72 h                                    |
| Subkulturintervall          | ?                                       |
| Zell-Charakteristika        | Vorherrschend sind epithelartige Zellen |
| Kulturmedium                | CHIU und BLACK's (1967) Medium          |
| Autor                       | CHIU und BLACK, 1969                    |

|                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Spezies                     | <u>Agallia quadripunctata</u>  |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen         |
| Art des Wachstums           | Einschichtzellkultur           |
| Populationsverdopplungszeit | ?                              |
| Subkulturintervall          | ?                              |
| Zell-Charakteristika        | ?                              |
| Kulturmedium                | CHIU und BLACK's (1967) Medium |
| Autor                       | CHIU und BLACK, 1969           |

Fortsetzung Tabelle 1

B L A T T A R I A

|                                  |                                     |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Spezies                          | <u>Blabera fusca</u>                |
| Ausgangsgewebe                   | Zerkleinerte Embryonen, trypsiniert |
| Art des Wachstums                | ?                                   |
| Populationsverdopp-<br>lungszeit | ?                                   |
| Subkulturintervall               | ?                                   |
| Zell-Charakteristika             | ?                                   |
| Kulturmedium                     | LANDUREAU's (1968) Medium           |
| Autor                            | LANDUREAU, 1968                     |

-----

|                                  |                                     |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Spezies                          | <u>Blatella germanica</u>           |
| Ausgangsgewebe                   | Zerkleinerte Embryonen, trypsiniert |
| Art des Wachstums                | ?                                   |
| Populationsverdopp-<br>lungszeit | ?                                   |
| Subkulturintervall               | ?                                   |
| Zell-Charakteristika             | Die meisten Zellen sind diploid     |
| Kulturmedium                     | LANDUREAU's (1968) Medium           |
| Autor                            | LANDUREAU, 1968                     |

-----

|                                  |                                                   |
|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| Spezies                          | <u>Periplaneta americana</u>                      |
| Ausgangsgewebe                   | Zerkleinerte Embryonen, trypsiniert               |
| Art des Wachstums                | ?                                                 |
| Populationsverdopp-<br>lungszeit | ?                                                 |
| Subkulturintervall               | Zweimal pro Woche                                 |
| Zell-Charakteristika             | Zellen sind euploid; Zellen produzieren Chitinase |
| Kulturmedium                     | LANDUREAU's (1968) Medium                         |
| Autor                            | LANDUREAU, 1968                                   |

Fortsetzung von Tabelle 1 BLATTARIA

|                             |                                                  |
|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| Spezies                     | <u>Periplaneta americana</u>                     |
| Ausgangsgewebe              | Zerkleinerte Embryonen, trypsiniert              |
| Art des Wachstums           | ?                                                |
| Populationsverdopplungszeit | ?                                                |
| Subkulturintervall          | Einmal in 14 Tagen                               |
| Zell-Charakteristika        | Karyotyp ist polyploid und bei vielen Zellen 16n |
| Kulturmedium                | LANDUREAU's (1968) MEDIUM                        |
| Autor                       | LANDUREAU, 1968                                  |

Von einigen Insektenzell-Linien sind Zellklone entwickelt worden. Unter einem Zellklon versteht man eine Population von Zellen, die sich durch Mitosen von einer einzigen Zelle ableitet.

SUITOR et al. (1966) konnten als erste von Insekten einen Zellklon entwickeln. Die Autoren isolierten nach vielen Versuchen mit Hilfe der Kapillarröhrchenmethode eine spindelförmige Zelle von GRACE's (1966) *Aedes aegypti* - Zell-Linie.

GRACE (1968) dagegen konnte von Zellen der von ihm etablierten *Antheraea eucalypti* - Linie Zellklone gewinnen, nachdem er durch Verwendung der Verdünnungsmethode Einzelzellen erhalten hatte.

Durch das Klonen konnten Zellen bestimmter Eigenschaften isoliert werden. LANDUREAU (1968) gelang die Isolierung und Vermehrung von Zellen der *Periplaneta americana* - Linie, die Chitinase produzierten. Diese Zellklone wurden dann wie normale Subkulturen weitervermehrt.

#### 1.4. Biologie der Arthropodenzellen

##### 1.4.1. Morphologie

##### 1.4.1.1. Primärzellen

Primärzellen weisen keine einheitliche Morphologie auf. Es liegen meist alle möglichen Zelltypen nebeneinander vor. Wie bei Vertebraten kommen fibroblastenartige, epithelartige und sphärische Zellen vor. Ein den Fibroblasten ähnlicher Zelltyp, die spindelförmige Zelle, ist am häufigsten anzutreffen, während die epithelartige Zelle seltener als die fibroblastenartige Zelle zu finden ist. Im Allgemeinen ist die Anzahl der Zelltypen in einer Primärkultur von der Art der Gewebeaufbereitung abhängig: aus Explantaten wachsen weniger unterschiedliche Zelltypen aus, während nach Trypsinierung der Gewebe häufig viele verschiedenartige Zellmorphologien nachweisbar sind.

SINGH (1967) berichtete über die Entwicklung einer Zell-Linie aus Larven von *Aedes albopictus* nach Trypsinierung der Larven und Einsaat der Zellen in M-M Medium (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964). Die Zellen setzten sich an der Glasunterlage fest und wuchsen in einer Einschichtzellkultur aus, in der 3 Zelltypen nachgewiesen werden konnten: hauptsächlich fanden sich runde Zellen mit einem Durchmesser von 6-20  $\mu$ , daneben spindelförmige von 7-10  $\mu$  Breite und 15-90  $\mu$  Länge. Runde, zweikernige Zellen mit 37-53  $\mu$  Durchmesser waren ebenfalls vorhanden.

TOKUMITSU und MARAMOROSCH (1966) erhielten bei der Kultivierung von explantierten Gewebestückchen von *Acyrtosiphum pisum* im wesentlichen 2 Typen von fibroblastenähnlichen Zellen. Der eine Typ war langgestreckt mit 8  $\mu$  Breite und 120  $\mu$  Länge bei einem Kerndurchmesser von 6  $\mu$ , der andere war 6  $\mu$  breit und 80  $\mu$  lang mit einem Kerndurchmesser von 4  $\mu$ . Nach Trypsinieren

der Gewebe beobachteten sie neben Fibroblasten auch Klumpen gleichförmiger,  $10\ \mu$  breiter und  $20\ \mu$  langer Zellen. Weiterhin wurden noch andere Zelltypen gefunden. Sie waren jedoch nicht vermehrungsfähig und degenerierten 10 Tage nach der Einsaat.

Während bei Vertebraten 3 Arten von Blutzellen, Granulocyten, Lymphocyten, Monocyten vorkommen, konnte MITSUHASHI (1965) bei der Kultur von Hämocyten aus *Chilosuppressalis* 7 Zelltypen unterscheiden:

Prohämocyten, sphärische Zellen von  $10\ \mu$  Durchmesser und einer Kerngröße von  $3\ \mu$ ;

Plasmatocyten, sphärische oder ellipsoidartige Zellen mit dicht angeordneten, dünnen Plasmafortsätzen. In der Hämolymphe haben sie einen Durchmesser von  $10\ \mu$  mit einem Kerndurchmesser von  $3\ \mu$ . Sie setzten sich nach Einsaat leicht an der Glasunterlage fest, wurden flach und streckten das Zytoplasma aus. Es ließen sich dann verschiedene große Zellen von  $20-40\ \mu$  Durchmesser und Kerngrößen von  $7-15\ \mu$  unterscheiden;

Granulocyten, granuliert, sphärische oder ellipsoidartige Zellen mit kurzen, feinen Plasmaauswüchsen. Sie setzten sich sehr schnell an der Glasunterlage fest und streckten ihr mit vielen verschieden großen Granula angefülltes Cytoplasma aus. Frei in der Hämolymphe hatten diese Zellen und Kerne einen Durchmesser von  $10\ \mu$  bzw.  $3\ \mu$ , während in der Kultur eine Größenzunahme auf  $25\ \mu$  und  $5\ \mu$  erfolgte; "Spherule" Zellen, runde Hämocyten mit unregelmäßigem Umriss und großen Cytoplasmaeinschlüssen von bis zu  $3\ \mu$  Größe. Der Durchmesser der Zellen, die sich nur sehr selten an der Glasunterlage festsetzten, war  $10\ \mu$  bei einem Kerndurchmesser von  $3\ \mu$ ;

Oenocytoide waren ellipsoide oder eiförmige Zellen von  $20\ \mu$  Größe. Der Kern hatte einen Durchmesser von  $10\ \mu$ . Die Zellen setzten sich nur selten an der Glasunterlage fest;

Podocyten, sternförmige Zellen, die als einzige in der Hämolymphe sehr flach waren. Der Durchmesser der Zelle lag bei  $20\text{ }\mu$ , der des Kernes bei  $8\text{ }\mu$ . Die Zellen setzten sich nie an der Glasunterlage fest;

Wurmförmige Zellen mit spitz zulaufenden Enden. Ihre Länge differierte zwischen  $20\text{ }\mu$  und  $150\text{ }\mu$  und der Kerndurchmesser betrug  $2\text{ }\mu$ . Die Zellen setzten sich nie an der Glasunterlage fest.

Von allen Zelltypen waren nur 2 vermehrungsfähig: Prohämocyten und Plasmacyten. Alle anderen Zellen gingen schon nach kurzer Zeit zugrunde.

Eine Besonderheit stellten die Vesikel dar. Die bis zu 2 mm großen sphärischen Gebilde bestanden aus miteinander verbundenen epitheloiden oder ellipsoiden Zellen einer einzigen zu einer Kugel geformten Zellschicht. Der dabei gebildete Hohlraum war mit Kulturmedium angefüllt. Die Bildung dieser Vesikel scheint ein Weg der Zellvermehrung zu sein, durch die die Zellen bei der Bildung von Einschichtzellkulturen unabhängig von der Glasunterlage des Kulturgefäßes sind (MITSUHASHI, 1965). Sie sind in Kulturen von Homoptera (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964), Lepidoptera (MITSUHASHI, 1965), Blattaria (LARSEN, 1964; 1967; MARKS und REINECKE, 1964), Diptera (SINGH, 1967; SCHNEIDER, 1969) und Zecken, (REHACEK, 1971) gefunden worden.

#### 1.4.1.2. Zell-Linien

Insektenzell-Linien enthalten einheitlichere Zellen als Primärkulturen. Vorherrschend ist meist nur ein Zelltyp, der sich im Laufe von kontinuierlichen Subkulturen herausselektiert hat, als Beispiele seien hier die spindelförmigen Zellen bei Bombyx mori (GRACE, 1967) mit  $12\text{--}25\text{ }\mu$  Breite und  $50\text{--}70\text{ }\mu$  Länge oder die epithelartigen Zellen bei Anopheles stephensi

(SCHNEIDER, 1969) mit 4-9  $\mu$  Durchmesser und 12-20  $\mu$  Länge aufgeführt.

Ähnliche Größenverhältnisse wie bei *Bombyx mori* weisen die spindelförmigen Zellen von *Aedes aegypti* (GRACE, 1966) mit 8-10  $\mu$  Weite und 40-50  $\mu$  Länge auf. Sphärische bis ellipsoide Zellen, als hauptsächlicher Zelltyp, traten bei *Heliothis zea* (HINK und IGNOFFO, 1970) und *Aedes albopictus* (SINGH, 1967) auf. Der Durchmesser wird zwischen 6  $\mu$  und 26  $\mu$  angegeben.

Andere Zell-Linien enthielten 2-3 Zelltypen nebeneinander, z.B. *Antheraea eucalypti* (GRACE, 1962) mit polygonalen Zellen von 20-40  $\mu$  Durchmesser, runden bis fibroblastenartigen Zellen von 15-20  $\mu$  Durchmesser und kleinen runden Zellen von 10-15  $\mu$  Durchmesser; oder *Carpocapsa pomonella* (HINK und ELLIS, 1971) wo 70% der Zellen eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von 11-20  $\mu$  hatten; 22% wiesen einzelne, protoplasmatische Ausstülpungen auf, 7% waren spindelförmig.

Unterschiedliche Morphologien können jedoch Zellen aus verschiedenen Zell-Linien auch bei gleichem Ursprung der Gewebe haben: so waren Zellen der *Anopheles stephensi* - Linie von SCHNEIDER (1969) epithelartig während die von PUDNEY und VARMA (1971) eine fibroblastenähnliche Morphologie aufwiesen, obwohl sie ursprünglich gleichen Geweben entstammten, nämlich Larven aus dem ersten Larvenstadium. Offensichtlich hatten sich hier 2 verschiedene Zelltypen der Larven selektiert.

#### 1.4.2. Vermehrung von Zellen

Anders als bei Primärzellen von Vertebraten benötigen Primärzellen von Arthropoden im allgemeinen zur Proliferation relativ lange Anlaufzeiten. Übereinstimmend wurde berichtet, daß sich Zellen oder Explantate einige Zeit nach ihrer Einsaat an der Unterlage der Kulturgefäße festsetzten, jedoch setzte danach zu verschiedenen Zeitpunkten die Vermehrung von Zellen, von Einzelzellen selbst oder randständig von Explantaten ausgehend, ein.

Zum Beispiel benötigten Zellen von *Antheraea eucalypti* (GRACE, 1962) 10 Monate Ruhezeit bis zur Proliferation und zur erfolgreichen Durchführung von Subkulturen.

Obwohl manche Primärzellen schon relativ kurz nach ihrer Inkubierung mit der Vermehrung begannen und subkultiviert werden konnten (Hämocyten von *Samia cynthia* - Larven nach 1 Woche, CHAO und BALL, 1971), trat meistens eine Ruheperiode der Zellen ein. Trypsinierte Ovarienzellen von *Heliothis zea* benötigten unter langsamer Vermehrung 2 Monate, bis sich eine Einschichtzellkultur gebildet hatte (HINK und IGNOFFO, 1970). Das Medium (IMC-1) wurde während dieser Zeit alle 12-14 Tage zu 80% ersetzt. Nach Durchführung der ersten Subkultur begannen die Zellen innerhalb von 19 Stunden nach dem Festsetzen sich zu vermehren.

Die Gründe für die lange Ruhephase der Zellen bis zum Beginn ihrer Vermehrung sind bis heute unbekannt, obgleich einzelne Kriterien, wie das Nährmedium eine Rolle zu spielen scheinen: HINK (1970) benutzte bei der Kultivierung von zerkleinerten Ovarien von *Trichoplusia ni* das Nährmedium von YUNKER et al. (1967). Innerhalb von 2 Wochen wuchsen Zellen von den Explantaten aus.

Obwohl das Medium 7 Monate lang alle 14 Tage gewechselt wurde, zeigten die Zellen keine mitotische Aktivität. Erst als dann das Medium geändert wurde (TNM-FH, ein modifiziertes GRACE-Medium), begannen die Zellen 10 Tage später mit starker Vermehrung und konnten alle 6-7 Tage subkultiviert werden.

Ein weiterer Faktor, der für die Länge der Ruhephase entscheidend ist, ist die Verwendung verschiedener Entwicklungsstadien von Arthropodengeweben z.B. von Puppen und Embryonen. Die Verwendung von embryonalen Geweben für die Zellkultur zielt auf eine Gewinnung von undifferenzierten Zellen, deren hohe mitotische Aktivität in vivo für das in-vitro-System ausgenützt werden soll.

So untersuchten HIRUMI und MARAMOROSCH (1964 b) die 11-12 Tage dauernde Entwicklungszeit von *Macrostelea fasciata* - Embryonen auf den günstigsten Entnahmezeitpunkt für die Gewebe- und Zellkultur. Die Autoren fanden, daß zufriedenstellende Ergebnisse nur bei Verwendung von Embryonen am 7.-8. Tag der Entwicklung erzielt werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt, gegen Ende des Blastokinese-Stadiums, führt der Embryo eine rotationsartige Bewegung im Ei aus, wobei die mitotische Aktivität der Gewebe gestoppt wird.

ECHALIER und OHANESSIAN (1968) fanden, daß sich *Drosophila* - Embryonen aus 8-14 Stunden alten Eiern nach der Befruchtung am besten zur Kultivierung eigneten, obwohl die größte mitotische Aktivität nach 5-6 Stunden (bei 25°C) erreicht ist.

LANDUREAU (1966) konnte an *Blattaria fusca* (Blattaria) zeigen, daß das am besten verwendbare Stadium

erst zu einem relativ späten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung erreicht ist, in welchem bereits ein funktionelles Dorsalgefäß ausgebildet ist.

Aus den genannten Arbeiten scheint die Verwendung von embryonalen Geweben während der größten mitotischen Aktivität der Zellen in-vivo nicht vorteilhaft zu sein. Zufriedenstellende Ergebnisse für die in-vitro-Vermehrung scheinen sich aber von embryonalen Geweben erzielen zu lassen, die sich in einer Ruhephase befinden. Zu diesem Zeitpunkt, im späten embryonalen oder frühen postembryonalen Stadium ist nur noch von 3 Zelltypen der Embryonen eine stärkere mitotische Aktivität nachweisbar: von Nervenzellen, Hämocyten und Zellen von Imaginalscheiben. Als Quelle nichtdifferenzierter Zellen sind diese Hämocyten und Imaginalscheiben mit Erfolg bei *Lepidoptera* verwendet worden (KURTTI und BROOKS, 1970). Jedoch kann nach der Verwendung von Embryonen die Herkunft der kultivierten Zellen dem Ursprungsgewebe nicht mehr zugeordnet werden.

Wenn die Zellvermehrung in Primärkulturen von Insekten auf der einen Seite diskontinuierlich und meistens nicht reproduzierbar abläuft, so ist bei permanenten Insektenzell-Linien ein unbegrenztes, ständiges Zellwachstum zu beobachten.

Bei den einzelnen Linien weist die Populationsverdopplungszeit recht unterschiedliche Werte auf. Sie umfaßt bei *Trichoplusia ni* (HINK, 1970) und *Anopheles stephensi* (PUDNEY und VARMA, 1971) mit 16 Stunden den kürzesten Zeitraum gegenüber 108 Stunden von *Chilo suppressalis* (MITSUHASHI, 1967) als längstem Zeitraum. Die meisten der anderen Zell-Linien haben Populationsverdopplungszeiten zwischen 24-33 Stunden (*Carpocapsa pomonella*, HINK und ELLIS, 1971 bzw. *Heliothis*

z e a , HINK und IGNOFFO, 1970) oder sie liegen mit 48-72 Stunden ( B o m b y x m o r i , GRACE, 1967 bzw. A g a l l i a c o n s t r i c t a , CHIU und BLACK, 1967) höher. Dem Vermehrungszyklus entsprechend werden die Subkulturintervalle zwischen 2 Tagen ( T r i c h o p l u s i a n i ) und 12 Tagen ( A e d e s v i t t a t u s , SINGH, 1970) angegeben.

### 1.4.3. Kulturbedingungen

#### 1.4.3.1. Nährstoffbedürfnisse und Stoffwechsel

Arthropodenzellen haben andere Nährstoffbedürfnisse als Vertebratenzellkulturen in vitro. Es mußten daher neue Kulturmedien entwickelt werden.

Ein für die Entwicklung eines Kulturmediums gut zu verwendendes Kriterium ist die Zusammensetzung von Hämolymphe. WYATT (1956) verwandte für die Kultivierung von Zellen aus explantierten Ovarienstückchen von B o m b y x m o r i erfolgreich ein Medium, das auf Analysen von B o m b y x m o r i - Hämolymphe basierte (WYATT, LOUGHEED und WYATT, 1956). Das Medium enthielt Bestandteile, die sich in 4 Gruppen zusammenfassen lassen. 1. Anorganische Salze mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , KCL und  $\text{CaCl}_2$ ; 2. Zucker mit Glucose, Fructose und Saccharose; 3. Organische Säuren mit Äpfelsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure und Fumarsäure; 4. 22 Aminosäuren von denen 8 in gleichen Mischungen aus D- und L-Form verwendet wurden.

Auffällig ist, daß die Gesamtkonzentration von  $\text{Na}^+$ -Ionen dieses Mediums mit 8 Millimol (mM)/Liter ca. 18 mal geringere Werte aufweist als die Konzentration in Vertebratenserum mit etwa 142 mM/Liter. Dafür lag der Wert für Kalium mit 80 mM/Liter etwa 16 mal höher gegenüber 5 mM/Liter beim Serum von Vertebraten. Die Konzentration von Calcium war mit 12 mM/Liter etwa ebenso hoch und bei Magnesium lag der Wert mit 32 mM/Liter

10 mal höher gegenüber etwa 3,2 mM/Liter beim Serum von Vertebraten.

Im allgemeinen sind hinsichtlich der Zusammensetzung der Hämolymphe bei verschiedenen Insekten, ja sogar innerhalb verwandter Spezies keine einheitlichen Werte für die Anteile anorganischer Salze gefunden worden. Bei verschiedenen Hämolympphen schwankt das Verhältnis der molaren Konzentrationen von Natrium zu Kalium (Na/K-Verhältnis) zwischen den Werten 0,1 und 25 gegenüber 28 im Serum von Menschen. Bei sich mit pflanzlicher Nahrung ernährenden Insekten ist das Verhältnis  $< 1$ , bei sich tierisch ernährenden  $> 1$ . Bei Insekten mit gemischter, von Pflanzen und Tieren stammender Nahrung schwankt die Relation zwischen den sich daraus ergebenden Werten. Das Verhältnis der intrazellulären Konzentration von Natrium und Kalium jedoch liegt wie bei Menschen zwischen 0,3 und 0,4 (GRACE, 1963).

Die Tatsache, daß die intrazelluläre Kaliumkonzentration in den Geweben aufrecht erhalten wird, während sie in der Hämolymphe niedrigere Werte aufweist, hat zu der Annahme geführt, daß Änderungen der Ionenkonzentration von Geweben und Zellen aus Insekten eher toleriert werden als von Vertebraten. Tatsächlich scheint das Überleben von Geweben aus Insekten für einige Wochen in Kulturmedien für Säugertierzellkulturen wie TC 199 (LOEB und SCHNEIDERMAN, 1956; BECKEL, 1956) oder verdünntem Meerwasser (LEWIS, 1916; LEWIS und ROBERTSON, 1916; STERN, 1940) diese Annahme zu bestätigen. Jedoch spielt gerade das Na/K-Verhältnis im Kulturmedium eine wichtigere Rolle für die Insektenzellkultur als die Änderung der Konzentration der anderen Ionen (CARLSON, 1961; PELEG, 1965; TING und BROOKS, 1965).

Neben Glucose und Fructose, beide Zucker in relativ geringer Konzentration, fand sich in der Hämolymphe das Disaccharid

Trehalose, das mit etwa 90% den Hauptanteil aller Zucker stellte. GRACE (1963) konnte ohne Unterschied entweder Trehalose oder Saccharose zusammen mit Fructose und Glucose im Kulturmedium verwenden, als jedoch Trehalose als einziger Zucker verwandt wurde, trat eine Hemmung des Zellwachstums ein.

Organische Säuren kommen in der Hämolymphe in relativ hoher (etwa 10 - 100facher Konzentration verglichen mit der in Humanserum) Konzentration vor. WYATT (1956) stellte eine stimulierende Wirkung von Äpfelsäure auf das Zellwachstum fest, die sich noch durch Kombination der Äpfelsäure mit  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure und Fumarsäure erhöhte.

Die vielleicht hervorstechendste Eigenschaft der Hämolymphe ist die hohe Konzentration an freien Aminosäuren, die gegenüber den Vertebraten etwa das 10 - 20fache beträgt. Es sind 21 - 22 Aminosäuren nachweisbar, obgleich die tatsächlich vorkommende Anzahl sowie die Konzentration im Insekt selbst und sogar von verschiedenen Entwicklungsstadien innerhalb derselben Spezies abhängt. Dabei fällt besonders die hohe Konzentration von Glutamin, Prolin, Arginin, Histidin oder Lysin auf (WYATT, 1961). Der gesamte osmotische Druck in der Hämolymphe wird zu 40% oder mehr von den Aminosäuren bestimmt.

In Humanserum ist der osmotische Druck zu etwa 92% durch den Anteil der anorganischen Salze festgelegt.

GRACE (1958) modifizierte das Medium von WYATT et al. (1956) hauptsächlich dadurch, daß er dem Medium Bestandteile des Vitamin-B-Komplexes zufügte: Thiamin, Riboflavin, Panthothenat, Pyridoxin, p-Aminobenzoesäure, Folsäure, Nicotinsäure und Biotin. Daneben ergänzte er das Medium weiterhin durch Zugabe von Cholinchlorid, myo(iso)Inositol und Natriumhydrogenkarbonat. Weitere

wichtige Änderungen des Mediums bestanden in dem Heraufsetzen des osmotischen Druckes durch das NaCl-Äquivalent von 0,72% auf 0,92% und im Heraufsetzen des pH-Wertes von 6,35 auf 6,5. Damit wurde das Medium den Hämolympfverhältnissen der *Saturniidae* angeglichen, von denen er mit *Antheraea eucalypti* (1962) die erste Insektenzell-Linie entwickeln konnte.

WYATT (1956) verwendete zur Vervollständigung seines Mediums 10% hitzeinaktivierte Hämolymphe von *Bombyx mori*. GRACE (1962) verringerte für die Kultivierung von *Antheraea eucalypti* ihren Anteil auf 5% und wendete dieses Medium ebenfalls erfolgreich zur Entwicklung von Zell-Linien aus Geweben von *Aedes aegypti* (1966) und *Bombyx mori* (1967) an. Die Verwendung von heterologer Hämolymphe als Mediumzusatz für Primärkulturen ist möglich, falls homologe Hämolymphe, wegen der Größe der Insekten z.B., schlecht oder überhaupt nicht gewonnen werden kann. SEN GUPTA (1964) konnte an Gewebekulturen von *Galleria mellonella*, *Antheraea pernyi* und *Melolontha melolontha* zeigen, daß ein signifikanter Unterschied zwischen homologer und heterologer Hämolymphe nicht aufgetreten ist.

RAHMAN et al. (1966) testeten verschiedene *Lepidoptera* - Hämolympfen als Ersatz der 3% *Antheraea pernyi* - Hämolymphe für GRACE's *Antheraea eucalypti* - Linie. Die Autoren fanden, daß sich neben 5 toxischen Hämolympfen nur die Hämolymphe von *Antheraea polyphemus* als gleich guter Ersatz erwies.

Daß Insektenhämolymphe keine unbedingte Voraussetzung für die Insektenzellkultur darstellt, ist von SEN GUPTA (1961) gezeigt worden. Das Wachstum von Zellen aus *Galleria mellonella* - Geweben wurde in Medien untersucht, die entweder nur Hämolymphe enthielten, oder, als Ersatz,

fötale Kälberserum, Yeast-Extrakt, Trehalose und organische Säuren. Obwohl sich das Medium mit Hämolymphe insgesamt gesehen als besser erwies, war das Wachstum der Zellen und das Überleben der Gewebe in dem Hämolymphe-freien Medium durchaus vergleichbar zu dem mit Hämolymphe.

Die sehr gute Eignung von fötalem Kälberserum für Insektenzellkulturen konnte von NAGLE et al. (1967), CONVERSE und NAGLE (1967), SOHI (1969) sowie HSU et al. (1970) an Zell-Linien bestätigt werden: die Autoren ersetzten in GRACE's Insektenmedium die Hämolymphe durch fötales Kälberserum (FBS) und konnten GRACE's *Aedes aegypti*-Zell-Linie an dieses Medium adaptieren. In Kombination mit fötalem Kälberserum haben sich als Hämolymphe-Ersatz ebenfalls Ultrafiltrat aus ganzen Hühnereiern (WEU) und Rinderserumalbumin (BSA) bewährt.

YUNKER, VAUGHN und CORY (1967) konnten GRACE's *Antheera eucalypti* (1962) an ein Medium adaptieren, das statt 5% *Bombyx mori*-Hämolymphe 10% FBS, 10% WEU und 1% BSA enthielt. Als den adaptierten Zellen wieder das ursprüngliche Medium zugeführt wurde, zeigten sich an den Zellen Degenerationserscheinungen.

In einer Reihe von Medien für die Kultivierung von Primärzellen und Zell-Linien sind weiterhin statt Aminosäuren und Vitaminen Lactalbumin-Hydrolysat (LAH) und Yeast-Extrakt (YE) mit Erfolg verwendet worden.

MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1964) entwickelten für die Kultivierung von Geweben aus *Lepidoptera* ein Medium das neben den anorganischen Salzen nur noch 0,4% Glucose, 0,65% LAH, 0,5% YE und 20% FBS enthielt. Dieses Medium verwendete SINGH (1967) erfolgreich für *Diptera* bei der Etablierung von Zell-Linien aus Primärkulturen von *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus*.

Lactalbumin-Hydrolysat wird im allgemeinen in Konzentrationen von 0,3% (HINK, 1970) bis 0,65% (MITSUHASHI und MAEMOROSCH, 1964; VARMA und PUDNEY, 1969) verwendet, obwohl auch Konzentrationen von 1% (KITAMURA, 1970) und 2% (HSU et al., 1970) beschrieben werden. Allerdings kann LAH in einer 1%igen Konzentration auch toxisch wirken, wie bei Kulturen von *Aedes vexans* von McHALE und SWEET (1971) beobachtet wurde.

Yeast-Extrakt findet in Konzentrationen von 0,2% (MITSUHASHI, 1967) bis 1,5% (ECHALIER und OHANESSIAN, 1970) Verwendung.

Der Gebrauch von fötalem Kälberserum, Hühnerei-Ultrafiltrat, Lactalbumin-Hydrolysat, Yeast-Extrakt und Rinderserumalbumin als Mediumbestandteil und Hämolymphe-Ersatz hat sich sowohl für Primärzellkulturen als auch Zell-Linien allgemein durchgesetzt.

Für die Kultivierung von Geweben und Zellen von Zecken eignen sich Medien, die aus Gemischen von Nährmedien für Vertebratenzellkulturen, Insektenzellkultur-Medien und/oder verschiedenen Zusätzen bestehen. Eine Reihe von Zellkulturstudien sind mit einem Medium durchgeführt worden, das sich aus dem von EAGLE (1955) für Vertebratenzellkulturen beschriebenen Medium und VAGO und CHASTANG's (1960) Medium in einem Mischungsverhältnis von 1:1 bei Zusatz von 0,1% lyophilisiertem Kälberserum zusammensetzte (REHACEK, 1962; 1965 a). Lyophilisiertes Kälberserum konnte jedoch auch mit gutem Erfolg durch 10% fötales Kälberserum ersetzt werden (VARMA und PUDNEY, 1967). Gute Ergebnisse sind weiterhin mit HANKS' gepufferter Salzlösung, der Aminosäuren und Vitamine von EAGLE's Medium und 20% Rinderserum zugefügt sind, erzielt worden (MARTIN und VIDLER, 1962). YUNKER und CORY (1967) verwendeten Lactalbumin-Hydrolysat in HANKS' gepufferter Salzlösung mit Zusatz von 10% Kaninchenserum, 10% Hühnerei-Ultrafiltrat und 10 mg Rinderserumalbumin pro ml Medium: präimaginale Gewebe von *Dermacentor andersoni* zeigten für

246 Tage zelluläres Auswachsen, während das Gewebe selbst insgesamt 263 Tage überlebte.

Ein eigenes für Zecken bestimmtes Kulturmedium ist von REHACEK und BRZOSTOWSKI (1969 a) auf der Grundlage von *Boophilus microplus* - Hämolymphe entwickelt und erfolgreich für Zellkultur von *Rhipicephalus sanguineus* verwendet worden. REHACEK und BRZOSTOWSKI (1969 b) stellten dabei fest, daß von den Zellen verschiedene Aminosäuren wie Leucin, Methionin, Threonin, Phenylalanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure aufgenommen wurden, während andere Aminosäuren keine Änderung der Konzentration im Medium zeigten.

Aus den in Gramm-Prozent angegebenen Werten für die Kationen der Hämolymphe ( $\text{Na}^+$  mit 0,3;  $\text{Mg}^{2+}$  mit 0,003;  $\text{Ca}^{2+}$  mit 0,012 und  $\text{K}^+$  mit 0,06) sind die physiologischen Verhältnisse der Zecken denen der Vertebraten sehr ähnlich. Diese Beobachtungen wurden durch die empirische Konzeption der vorangegangenen Kulturmedien für Zeckenzellkulturen bestätigt. Die Konzentration der Aminosäuren liegt ebenfalls in der Größenordnung wie die der Medien für Vertebratenzellkulturen. Im Unterschied zu Insekten ist Glucose mit 0,5% in relativ starker Konzentration vorhanden. Eine Besonderheit stellt die ebenfalls starke Konzentration von freiem Inosit mit 0,04% dar.

Im Gegensatz zu den großen Unterschieden in der Zusammensetzung von Hämolymphe zwischen verschiedenen Insekten und sogar verschiedener Entwicklungsstadien einer Spezies (FLORKIN und JEAUNIAUX, 1964) ist die Zahl der Insektenkulturmedien sehr gering. (s. Seite 80). Der Grund dafür scheint in der Fähigkeit von Insektenzellen zu liegen, sich veränderten in-vitro-Bedingungen, wie die Änderung des Kulturmediums, anzupassen. Beispiele dafür sind die *Lepidoptera*- und *Diptera*-Zell-Linien, die beide mit GRACE's (1962) Insektenkulturmedium, das

ursprünglich auf der Basis der Hämolymphe für *Bombyx mori* entwickelt wurde, oder zumindest mit Modifikationen gezüchtet werden können: *Antheraea eucalypti* - *Aedes aegypti* (GRACE's Medium, GMA, + 5% *Bombyx mori* - Hämolymphe), *Trichoplusia ni* - *Anopheles stephensi* (GMA modifiziert).

Schwierigkeiten in der Anpassung dagegen treten meist bei der Kultivierung von Primärzellen auf, die gewöhnlich durch eine Ruhephase während der Adaptationszeit an das in-vitro-System gekennzeichnet sind (z.B. GRACE, 1962; HINK, 1970).

Inwieweit die einzelnen Bestandteile des Kulturmediums essentiell für die Ernährung der Zellen sind, ist bisher nur in wenigen Fällen untersucht worden. GRACE und BRZOSTOWSKI (1966) analysierten den Aminosäureverbrauch aus GRACE's (1962) Medium durch die *Antheraea eucalypti* - Zell-Linie während einer Dauer von 7 Tagen. Sie fanden, daß 14 von 21 Aminosäuren im Medium in der Konzentration abnahmen, während die verbleibenden 7 Aminosäuren in der Konzentration entweder unverändert blieben oder sogar zunahmen. Die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose sind zu 90%, 60% bzw. 23% ausgenutzt worden.

Weiterhin prüften LANDUREAU und JOLLÈS (1969) Blattarria - Zellen auf ihren Aminosäurebedarf durch jeweiliges Herauslassen einer Aminosäure. Die Autoren fanden heraus, daß 16 Aminosäuren gegenüber ursprünglich 17 essentiell waren. Darüber hinaus konnte LANDUREAU (1969) zeigen, daß 2 Vitamine des Vitamin-B-Komplexes essentiell waren, während die Zellen Ascorbinsäure und p-Aminobenzoessäure für ihr Wachstum nicht benötigten.

Wie wichtig die ausreichende Nährstoffzuführung ist, geht aus einer Arbeit von SCHNEIDER (1971) hervor. Er vermutet, daß bei nicht optimalen Kulturbedingungen, vor allem die adäquater Kulturmedien, Eigenschaften von Zellen zerstört werden können, die für das Stadium physiologischer und epidemiologischer Studien eine Voraussetzung sind. Bestätigt werden diese Überlegungen durch SUITOR (1966 b), der fand, daß *Antheraea*-Zellen nicht mehr empfänglich für das Japanese B Encephalitis-Virus waren, nachdem sie an ein Medium adaptiert waren, das anstelle von *Antheraea pernyi*-Hämolymphe solche von *Philosamia cynthia* enthielt.

Ein wichtiger Faktor für einen funktionsfähigen Zellstoffwechsel ist für Arthropodenzellkulturen das Vorkommen von Sterinen (Sterolen) im Kulturmedium. Im Gegensatz zu Vertebraten sind die Insekten nicht zur Synthese von Sterinen aus einfachen Vorstufen fähig (CLARK und BLOCK, 1959), können jedoch von außen zugeführte Sterole in Cholesterin umwandeln (O'BRIEN und WOLFE, 1964). Einen Hinweis darauf, daß diese Verhältnisse in-vitro ebenfalls gegeben sind, fanden STANLEY und VAUGHN (1967). Sie beobachteten nach Zugabe des Mycostatikum Amphotericin B eine Abhängigkeit der Insektenzellen von außen zugeführtem Cholesterin. Amphotericin B bindet offenbar die Sterine der Zellmembran und macht sie so der Zelle nicht verfügbar (LAMPEN et al., 1965). VAUGHN et al. (1971) konnte an in Hämolymphe-freien Medien gezüchteten *Antheraea eucalypti*-Zellen (YUNKER et al., 1967) zeigen, daß den Zellen Sterine durch fötales Kälberserum und Rinderserumalbumin als Zusätze von GRACE's Insektenmedium, zugeführt wird. Ebenfalls signifikant nachweisbar war die bevorzugte Aufnahme von freiem Sterin in Konkurrenz zum serumgebundenen.

In einer vergleichenden Studie zogen JENKIN et al. (1971) Vergleiche zwischen dem Lipidstoffwechsel bei Arthropoden-

und Vertebratenzellkulturen, wobei klonisierte *Aedes aegypti*-Zellen (SUITOR et al., 1966 a) und MK-2-Zellen (Monkey Kidney; HULL et al., 1962) verwendet wurden. Es zeigte sich, daß die *Aedes aegypti*-Zellen mit 44% Lipidgehalt eine etwa 3 mal so hohe Konzentration wie die der MK-2-Zellen mit 15% aufwiesen.

Auffällig war darüber hinaus die relativ hohe Konzentration der freien Fettsäuren mit 49,5% gegenüber 4,2% der MK-2-Zellen. Offensichtlich scheinen Arthropoden bei der Energieversorgung wesentlich abhängiger vom Lipidstoffwechsel als von Kohlehydraten zu sein.

#### 1.4.3.2. Kulturmedien

Die ersten Zell-Linien (GRACE, 1962; 1966) sind mit GRACE's (1962) Insektenkulturmedium (GMA) gezüchtet worden. Für die Entwicklung einiger anderer Zell-Linien konnte es ebenfalls, wenn auch zum Teil in abgewandelter Form, erfolgreich verwendet werden.

In der folgenden Zusammenstellung sind die Nährmedien der Insektenzell-Linien aufgeführt. Daneben wurden einige wichtige Medien für Primärkulturen mit aufgenommen.

GRACE's (1962) Insektenkulturmedium GMA

für: *Antheraea eucalypti*, *Aedes aegypti*, *Aedes vexans*, *Bombyx mori*, *Culiseta inornata* und als Mediumgrundlage.

Lösung A mg/100 ml

|                                                      |     |
|------------------------------------------------------|-----|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 114 |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 35  |
| KCl                                                  | 224 |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 100 |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 228 |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 278 |

Lösung B

|                  |      |
|------------------|------|
| L-Arginin · HCl  | 70   |
| L-Asparaginsäure | 35   |
| L-Asparagin      | 35   |
| L-Alanin         | 22,5 |
| β-Alanin         | 20   |
| L-Cystin · HCl   | 2,5  |
| L-Glutaminsäure  | 60   |
| Glycin           | 65   |
| L-Histidin       | 250  |
| L-iso-Leucin     | 5    |
| L-Leucin         | 7,5  |
| L-Lysin · HCl    | 62,5 |
| L-Methionin      | 5    |
| L-Prolin         | 35   |
| L-Phenylalanin   | 15   |
| DL-Serin         | 110  |
| L-Tyrosin        | 5    |
| L-Tryptophan     | 10   |
| L-Glutamin       | 60   |
| L-Threonin       | 17,5 |
| L-Valin          | 10   |

Lösung C

|            |      |
|------------|------|
| Saccharose | 2668 |
| Fructose   | 40   |
| Glucose    | 70   |

Lösung D

|                     |     |
|---------------------|-----|
| Äpfelsäure          | 67  |
| α-Ketoglutarinsäure | 37  |
| Bernsteinsäure      | 6   |
| Fumarsäure          | 5,5 |

Fortsetzung GRACE's (1962) Medium

| <u>Lösung E</u>     | mg/100 ml |
|---------------------|-----------|
| Thiamin . HCl       | 0,002     |
| Riboflavin          | 0,002     |
| Ca-Pantothenat      | 0,002     |
| Pyridoxin HCl       | 0,002     |
| p-Aminobenzoessäure | 0,002     |
| Folsäure            | 0,002     |
| Nicotinsäure        | 0,002     |
| iso-Inositol        | 0,002     |
| Biotin              | 0,001     |
| Cholinchlorid       | 0,02      |

Antibiotika

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Penicillin G, Na-Salz | 3  |
| Streptomycinsulfat    | 10 |

Bestandteile von A werden in 20 ml, von B in 30 ml, von C in 20 ml und von D in 20 ml Aqua dest. separat gelöst und dann miteinander vermischt. Das Calciumchlorid wird in einer kleinen Menge Wasser gelöst und der Lösung zugegeben. Dann werden die Vitamine (Lösung E) zugefügt (Stammlösung 1000fach) und das Endvolumen mit Aqua dest. auf 100 ml gebracht. Der pH-Wert wird mit KOH auf 6,5 eingestellt. Die Antibiotika werden kurz vor der Sterilisierung des Mediums durch Filtration durch ein gesintertes Glasfilter (Porosität 5) zugegeben.

Medium TNM-FH (HINK, 1970)

für: *Carpocapsa pomonella* und  
*Trichoplusia ni*.

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| GMA                   | 90 ml  |
| Fötale Kälberserum    | 8 ml   |
| Hühnerei-Ultrafiltrat | 8 ml   |
| Yeast Extrakt         | 300 mg |
| Lactalbuminhydrolysat | 300 mg |
| Rinderserumalbumin    | 500 mg |

Medium CSM-2F (MITSUHASHI, 1967)

für: *Chilo suppressalis*.

|                                                    | mg/100 ml |
|----------------------------------------------------|-----------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 50        |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$          | 120       |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          | 160       |
| KCl                                                | 120       |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$          | 40        |
| Glucose                                            | 80        |
| Fuctose                                            | 80        |
| Lactalbuminhydrolysat                              | 520       |
| Bacto-Pepton                                       | 520       |
| Yeast-Extrakt                                      | 200       |
| Cholinchlorid                                      | 40        |
| Fötales Kälberserum                                | 20 ml     |
| Medium TC 199                                      | 20 ml     |
| Dihydrostreptomycinsulfat                          | 10        |

Der pH-Wert wird mit KOH auf 6,2 eingestellt.

Medium IMC-1 (HINK und IGNOFFO, 1970)

für: *Heliothis zea*.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| GMA                   | 900 ml  |
| Fötales Kälberserum   | 100 ml  |
| Hühnerei-Ultrafiltrat | 100 ml  |
| Rinderserumalbumin    | 1000 mg |

Medium M-M (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964)

für: *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus*.

|                                                    | mg/ 80 ml |
|----------------------------------------------------|-----------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 20        |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$          | 10        |
| KCl                                                | 20        |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$          | 20        |
| NaCl                                               | 700       |
| $\text{NaHCO}_3$                                   | 12        |
| Glucose                                            | 400       |
| Lactalbuminhydrolysat                              | 650       |
| Yeast Extrakt                                      | 500       |

# Fortsetzung Medium M-M

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Fötales Kälberserum | 20 ml     |
| Penicillin          | 100 IE/ml |
| Streptomycin        | 100 ug/ml |

Das Medium wird vor der Zugabe von fötalem Kälberserum und den Antibiotica, die in 2 ml-Mengen pro 100 ml Medium als Stammlösung vorliegen, durch Filtration sterilisiert. Der pH-Wert wird mit KOH auf 6,5 eingestellt.

## KITAMURA's (1965) Medium

für: *Culex pipiens*.

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
|                                 | mg/100 ml |
| NaCl                            | 650       |
| KCl                             | 50        |
| CaCl <sub>2</sub>               | 10        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 10        |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 10        |

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Saccharose            | 1000 |
| Lactalbuminhydrolysat | 2000 |

|               |       |
|---------------|-------|
| Medium TC 199 | 20 ml |
|---------------|-------|

Der pH-Wert wird mit 0,5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf 7,0 - 7,2 eingestellt.

## PELEG's (1969) Medium

für: *Aedes aegypti*.

|                                                                                    |        |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                                                                                    | Vol. % |
| KITAMURA's (1965) Medium                                                           | 80     |
| Fötales Kälberserum                                                                | 10     |
| "Konditioniertes" Medium<br>(gebrauchtes Medium von voran-<br>gegangenen Kulturen) | 10     |

Medium VP<sub>12</sub> (VARMA und PUDNEY, 1969)

für: *Anopheles stephensi*

|                                                      | mg      |
|------------------------------------------------------|---------|
| NaCl                                                 | 390     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 55      |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 110     |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 120     |
| KCl                                                  | 55      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 40      |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 50      |
| Glucose                                              | 200     |
| Cholinchlorid                                        | 25      |
| Inositol                                             | 40      |
| Lactalbuminhydrolysat                                | 500     |
| Rinderserumalbumin                                   | 100     |
| 5%ige Glutaminlösung                                 | 0,6 ml  |
| Vitaminkonzentrat 100 x<br>(Basal-Medium EAGLE)      | 2,0 ml  |
| H <sub>2</sub> O                                     | 97,4 ml |
| Fötales Kälberserum                                  | 10%     |

SCHNEIDER's (1969) Medium

für: *Aedes vittatus* und *Anopheles stephensi*

|                                       | mg/100 ml |
|---------------------------------------|-----------|
| NaCl                                  | 300       |
| KCl                                   | 110       |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 114       |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 40        |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 35        |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 40        |
| Saccharose                            | 1600      |
| Glucose                               | 100       |
| Trehalose                             | 50        |
| Cholesterin-Lösung                    | 0,2 mg    |
| Phenolrot                             | 0,01%     |
| Fötales Kälberserum (inaktiviert)     | 15%       |

Cholesterin-Lösung: 5 mg werden in 5 ml 95%igem Äthanol gelöst. Dann werden 5ml einer 5%igen wässrigen Tween 80-Lösung zugegeben. Mit +90°C heißem Aqua tridest. wird auf

50 ml aufgefüllt. Das Medium wird vervollständigt durch Zugabe von GRACE's (1962) Aminosäuren und 1% einer 10fach konzentrierten, modifizierten NCTC-135-Lösung (Zucker, Aminosäuren und Salze sind weggelassen).

KITAMURA's (1970) Medium

für: *Culex molestus*

|                                       | mg      |
|---------------------------------------|---------|
| NaCl                                  | 650     |
| KCl                                   | 50      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 10      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 10      |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 10      |
| Glucose                               | 200     |
| Lactalbuminhydrolysat                 | 1000    |
| H <sub>2</sub> O                      | 100 ml  |
| Medium TC 199                         | 2 Teile |
| Kälberserum                           | 1 Teil  |

721-Medium (HSU et al., 1970)

für: *Culex quinquefasciatus*

| <u>Lösung A</u>                       | mg/100 ml |
|---------------------------------------|-----------|
| KCl                                   | 80        |
| NaCl                                  | 450       |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 35        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 40        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 25        |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 100       |
| Lactalbuminhydrolysat                 | 2000      |
| Glucose                               | 160       |
| Saccharose                            | 600       |
| Yeast Extrakt                         | 200       |
| Bacto-Pepton                          | 500       |
| Äpfelsäure                            | 60        |
| α-Ketaglutarsäure                     | 40        |
| Bernsteinsäure                        | 6         |
| Fumarsäure                            | 6         |

Lösung B

Medium TC 199

Lösung C

Fötales Kälberserum, inaktiviert

Die Bestandteile von A werden in Aqua dest. gelöst zu einem

Endvolumen von 100 ml. Der pH-Wert wird mit KOH auf 6,6 eingestellt. Die Lösung wird sterilisiert durch Filtration (Millipore Filter, 220 nm Porenweite). Die Lösungen A, B und C werden im Verhältnis 7 : 2 : 1 miteinander gemischt und der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.

Medium D-20 (ECHALIER und OHANESSIAN, 1970)

für: *Drosophila melanogaster*

|                                                      | mg/l  |                                                                                        |
|------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Glutaminsäure                                        | 7350  | Mit 10n KOH neutralisieren, mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, verwende 54 ml  |
| Glycin                                               | 3740  |                                                                                        |
| Glutaminsäure                                        | 7350  | Mit 10n NaOH neutralisieren, mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, verwende 94 ml |
| Glycin                                               | 3740  |                                                                                        |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 1000  |                                                                                        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 3700  |                                                                                        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 470   |                                                                                        |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 890   |                                                                                        |
| Yeast-Extrakt                                        | 1500  |                                                                                        |
| Lactalbuminhydrolysat                                | 15000 |                                                                                        |
| Glucose                                              | 2000  |                                                                                        |
| Äpfelsäure                                           | 670   |                                                                                        |
| Bernsteinsäure                                       | 60    |                                                                                        |
| Natriumacetat                                        | 25    |                                                                                        |

GRACE's (1962) Vitamine

Mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, der pH-Wert wird auf 6,7 eingestellt. Mediumzugabe von Fötalem Kälberserum erfolgt zwischen 10 - 20%.

Medium von CHIU und BLACK (1967)

für: *Homoptera*

|                                       | mg/100 ml |
|---------------------------------------|-----------|
| NaCl                                  | 105       |
| KCl                                   | 80        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 185       |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 30        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 30        |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 35        |
| Glucose                               | 400       |
| Lactalbuminhydrolysat                 | 650       |

# Fortsetzung Medium von CHIU und BLACK (1967)

|                     | mg/100 ml    |
|---------------------|--------------|
| Yeast Extrakt       | 500          |
| Fötales Kälberserum | 17,5 - 20 ml |
| Penicillin          | 10000 I.E.   |
| Streptomycin        | 10000 µg     |
| Neomycin            | 5000 µg      |
| "Fungizone"         | 250 µg       |

Der pH-Wert des Mediums beträgt ohne Einstellung 7,0. Die Herstellung des Mediums kann aus Stammlösungen erfolgen: die anorganischen Salze werden 5-fach konzentriert gelöst und steril filtriert. Jedoch wird das  $\text{NaHCO}_3$  separat 10-fach konzentriert gelöst (Sterilisieren erfolgt durch Autoklavieren). Stammlösungen von Glucose (4 g/100 ml), Lactalbumin Hydrolysat (3,25 g/100 ml) und Yeast Extrakt (5 g/100 ml) werden durch Filtration sterilisiert. Das fötale Kälberserum wird hitzeinaktiviert (kurz vor Gebrauch 30 Minuten bei  $+56^\circ\text{C}$ ). Entsprechende Lösungen werden zusammen mit fötalem Kälberserum auf ein Endvolumen von 100 ml eingestellt. Die Antibiotica aus Stammlösungen werden kurz vor Gebrauch dem Medium zugegeben.

## LANDUREAU's (1968) Medium

für: *Blabera fusca*, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*

|                                           | mM/l |
|-------------------------------------------|------|
| $\text{CaCl}_2$                           | 4,4  |
| KCl                                       | 12   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5,6  |
| NaCl                                      | 113  |
| $\text{NaHCO}_3$                          | 4,3  |
| $\text{H}_2\text{PO}_3$                   | 10   |
| Glucose                                   | 5,6  |
| Trehalose                                 | 25   |

Fortsetzung Medium von LANDUREAU (1968)

|                           | mm/l      |
|---------------------------|-----------|
| L- $\alpha$ -Alanin       | 1,35      |
| $\beta$ -Alanin           | 0,5       |
| Arginin · HCl             | 11,5      |
| L-Asparaginsäure          | 1,5       |
| L-Glutaminsäure           | 13,5      |
| L-Cystein · HCl           | 0,83      |
| L-Glutamin                | 4,1       |
| Glycin                    | 23,5      |
| L-Histidin                | 2,6       |
| L-Leucin                  | 1,9       |
| L-Lysin · HCl             | 0,88      |
| L-Methionin               | 3,4       |
| L-Prolin                  | 6,5       |
| L-Serin                   | 0,76      |
| L-Threonin                | 1,68      |
| L-Tyrosin                 | 2,0       |
| L-Valin                   | 1,3       |
| $\alpha$ -Ketoglutarsäure | 2,5       |
| Zitronensäure             | 0,8       |
| Fumarsäure                | 0,5       |
| Äpfelsäure                | 5,0       |
| Bernsteinsäure            | 0,5       |
| Folsäure                  | 0,00002   |
| Biotin                    | 0,00004   |
| Cholinchlorid             | 0,0013    |
| Inositol                  | 0,0001    |
| Nicotinsäureamid          | 0,00002   |
| Pyridoxin · HCl           | 0,0001    |
| Riboflavin                | 0,00005   |
| Thiamin · HCl             | 0,00006   |
| Ca-Pantothenat            | 0,00004   |
| Yeast Extrakt             | 500 mg/l  |
| Lactalbuminhydrolysat     | 3500 mg/l |
| Fötales Kälberserum       | 10%       |

Medium M-18 (MARKS et al., 1968; Rezept und Herstellung des Mediums: GIBCO, Grand Island, N.Y. 14072)

für: *Leucophaea maderae*

|                                       | mg/l |
|---------------------------------------|------|
| NaCl                                  | 1000 |
| KCl                                   | 400  |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 400  |

Fortsetzung Medium M-18

|                                                     | mg/l  |
|-----------------------------------------------------|-------|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O               | 450   |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                     | 300   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O | 200   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>                    | 400   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 300   |
| L-Tyrosin                                           | 166   |
| L-Lysin · HCl                                       | 200   |
| L-Histidin · HCl · H <sub>2</sub> O                 | 661   |
| L-Arginin · HCl                                     | 1000  |
| L-Asparaginsäure                                    | 400   |
| L-Asparagin                                         | 300   |
| L-Threonin                                          | 100   |
| L-Serin                                             | 200   |
| L-Prolin                                            | 500   |
| Glycin                                              | 600   |
| L-Alanin                                            | 100   |
| β-Alanin                                            | 200   |
| L-Valin                                             | 300   |
| L-Methionin                                         | 300   |
| L-iso-leucin                                        | 100   |
| L-Leucin                                            | 200   |
| L-Phenylalanin                                      | 100   |
| L-Cystin · 2HCl                                     | 113   |
| L-Glutaminsäure                                     | 1000  |
| L-Glutamin                                          | 1000  |
| Glucose                                             | 20000 |
| Saccharose                                          | 10000 |
| Trehalose                                           | 3000  |
| α-Ketoglutarsäure                                   | 300   |
| Fumarsäure                                          | 100   |
| Zitronensäure                                       | 100   |
| Äpfelsäure                                          | 500   |
| Bernsteinsäure                                      | 300   |
| Thiamin · HCl                                       | 0,02  |
| Riboflavin                                          | 0,02  |
| D-Ca. Pantothenat                                   | 0,02  |
| Pyridoxin · HCl                                     | 0,02  |
| p-Aminobenzoessäure                                 | 0,02  |
| Folsäure                                            | 0,02  |
| Biotin                                              | 0,01  |
| Cholinchlorid                                       | 0,20  |
| iso-Inositol                                        | 0,02  |
| Nicotinsäure                                        | 0,02  |
| Carnitin · HCl                                      | 0,01  |

Zeckenkulturmedium (REHACEK und BRZOSTOWSKI, 1968)

|                                                             | mg/1000 ml |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| NaCl                                                        | 6300       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 3910       |
| KHCO <sub>3</sub>                                           | 1630       |
| CaCl <sub>2</sub>                                           | 330        |
| MgSO <sub>4</sub>                                           | 290        |
| L-Alanin                                                    | 71         |
| L-Arginin · HCl                                             | 8          |
| L-Asparaginsäure                                            | 23         |
| L-Glutaminsäure                                             | 63         |
| Glycin                                                      | 42         |
| L-Histidin                                                  | 44         |
| L-iso-leucin                                                | 13         |
| L-Leucin                                                    | 50         |
| L-Lysin                                                     | 44         |
| L-Phenylalanin                                              | 43         |
| L-Prolin                                                    | 38         |
| DL-Serin                                                    | 67         |
| L-Threonin                                                  | 44         |
| L-Tyrosin                                                   | 33         |
| L-Valin                                                     | 164        |
| Glucose                                                     | 5000       |
| Inositol                                                    | 400        |
| Thiamin · HCl                                               | 0,02       |
| Riboflavin                                                  | 0,02       |
| Ca-Pantothenat                                              | 0,02       |
| Pyridoxin · HCl                                             | 0,02       |
| p-Aminobenzoesäure                                          | 0,02       |
| Folsäure                                                    | 0,02       |
| Nicotinsäure                                                | 0,02       |
| iso-Inositol                                                | 0,02       |
| Biotin                                                      | 0,01       |
| Cholinchlorid                                               | 0,2        |
| Rinderserumalbumin                                          | 10000      |
| Penicillin G, Na-Salz                                       | 30         |
| Streptomycinsulfat                                          | 100        |
| Phenolrot (0,7%) (pH 6,8)                                   | 7,14 ml    |
| Hitzeinaktivierte Hämolymphe<br>von <i>Antheraea pernyi</i> | 1%         |

#### 1.4.3.3. Wasserstoffionenkonzentration

Für die Kultivierung von Arthropodengewebe liegen die pH-Werte der Kulturmedien mit 6,4 - 7,0 insgesamt niedriger als unter Bedingungen der Mammalia-Zellkultur, obwohl auch Werte von 7,2 - 7,4 (LANDUREAU, 1968; EIDE und CHANG, 1969) als Medium-Optimum verwendet werden.

Überhaupt scheinen Schwankungen, in Grenzen, für das Zellwachstum nicht kritisch zu sein. So verwendete MITSUHASHI, (1967 a,b) für die Kultivierung verschiedener Gewebe aus *Lepidoptera* sowohl die Werte 6,2 und 6,5 erfolgreich und KURODA (1969) findet bei Kulturen von *Drosophila melanogaster* einen Optimalwert von 6,8 während HORIKAWA und FOX (1964) bei ihren Kulturen mit einem pH-Wert von 6,5 erfolgreich waren.

#### 1.4.3.4. Osmolarität

Die Wirkung der Änderung des osmotischen Druckes des Kulturmediums auf die Arthropodenzellkultur ist nur in wenigen Fällen untersucht worden. LANDUREAU (1968) fand an Kulturen von *Blattaria*, daß die Zellen sehr empfindlich auf die Änderung des osmotischen Druckes reagieren. Bedingt durch die stärkere Konzentration von Aminosäuren, Zuckern und zum Teil organischen Säuren liegt der osmotische Druck höher als bei Säugetiermedien. So wurde bei LANDUREAU's Kulturmedium (1966) für *Blattaria* eine Gefrierpunktserniedrigung um  $0,815^{\circ}\text{C}$ , bei dem synthetischen Zeckenzellkultur-Medium (REHACEK und BRZOSTOWSKI, 1969 a) eine Gefrierpunktserniedrigung um (umberechnet)  $0,63^{\circ}\text{C}$  gemessen. Bei Kulturmedien von Vertebraten liegen die Werte bei  $0,60 - 0,63^{\circ}\text{C}$ . Obgleich in vivo bei Verwendung von Lösungen mit extrem hohem osmotischen Druck ein "physiologischer Stress" (ELLSGAARD und KESSEL, 1966) der Zellen induziert wird (schrumpfen des Zellkerns, Puff-Bildung), fehlen bisher entsprechende Untersuchungen in-vitro.

#### 1.4.3.5. Bebrütungstemperatur

Arthropodenkulturen können zwischen  $+24^{\circ}\text{C}$  und  $+32^{\circ}\text{C}$  bebrütet werden. Temperaturschwankungen werden von den Zellen toleriert, obwohl sie auch einen Effekt auf das Zellwachstum ausüben können. MITSUHASHI erhielt bei Inkubation von *Chilo suppressalis* - Zellen außerhalb der Optimaltemperatur von  $+25^{\circ}\text{C}$  sowohl bei  $+20^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $+30^{\circ}\text{C}$  einen Rückgang der Zell-Konzentration. PELEG (1969) beobachtete an *Aedes aegypti* - Zellen ein Wachstum noch bei  $+37^{\circ}\text{C}$ . Jedoch hatten die Zellen dann nur eine Lebenserwartung von höchstens 30% gegenüber denen bei  $+28^{\circ}\text{C}$ . Sehr häufig benützte Bebrütungstemperaturen sind  $+27^{\circ}\text{C}$  und  $+28^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.4.3.6. Kulturgefäße

Ein Nachteil bei der in-vitro-Kultur von Insektenzellen ist die geringe Größe und Menge des Ausgangsgewebes. Eine im Prinzip bis heute gut zu verwendende Methode der Kultivierung von Arthropodengewebe ist die Kultur im "Hängenden Tropfen". Dabei wird ein Gewebestückchen zusammen mit einem Tropfen (ca. 0,005 ml) Kulturmedium auf ein Deckgläschen gepflanzt und umgekehrt auf einen Objektträger mit einer Vertiefung gelegt, so daß der Tropfen in der Vertiefung nach unten hängen kann, während das Gewebestückchen an der Unterseite des Deckgläschens haften bleibt. Durch Versiegeln des Deckgläschenrandes mit dem Objektträger mit Wachs, Vaseline oder Paraffin entsteht so eine luftdicht verschlossene Kulturkammer. WYATT (1956) beobachtete nach einem Tag von Rande explantierter Ovarienstückchen von *Bombyx mori* ausgehendes Zellwachstum. Nachteilig wirkt sich bei dieser Methode die technische Schwierigkeit des Mediumwechsels aus.

Eine ähnliche Möglichkeit ist die Kultivierung im "Sitzenden Tropfen", bei der die Explantate im Medium

auf einen Objektträger tropfenweise pipettiert werden. Ein zweiter Objektträger wird mit einem Abstandsring aufgelegt und an den Rändern mit Paraffin versiegelt. Diese Methode ist nach ihrer Weiterentwicklung zu V-H-Gewebekulturflaschen durch HIRUMI und MARAMOROSCH (1964 a) heute eine Standardmethode bei der Kultivierung von Zellen aus H o m o p t e r a - Geweben. In beiden Fällen ist eine gute mikroskopische Beobachtung der Kulturen gewährleistet.

VAUGHN und STANLEY (1970) benutzten mit Erfolg Mikroplatten (u.a. Linbro Co., New Havn, Connecticut) als Kulturgefäße von Explantaten von zerkleinerten und suspendierten Ovarienstückchen aus frisch verpuppten B o m b y x m o r i - Puppen. 2 - 3 kleine Gewebestückchen kamen zusammen mit 0,1 ml Medium (GMA modifiziert) in jede Vertiefung und die Kulturen wurden bei +26°C bebrütet. Diese Methode hat sich besonders bei der Virustitration bewährt, da von vornherein wenig Gewebematerial zur Verfügung stand. Die Gewebe blieben für 2 Wochen in gesundem Zustand.

Falls größere Mengen von Zellen oder Gewebefragmenten zur Verfügung stehen, lassen sich wie bei Säugetierkulturen Kulturflaschen und -röhrchen verwenden. Hier haben sich neben unterschiedlich geformten kleinen Glasflaschen besonders siliconbeschichtete Kunststoff-Flaschen z.B. Falcon Plasties Nr. 3012 mit einem Volumen von 30 ml (5 ml Zellsuspension) oder verschieden große Leighton-tubes, zum Anfertigen von Präparaten, bewährt. Es lassen sich sowohl Zell- als auch Gewebesuspensionen gut kultivieren.

### 1.5. Zellkonservierung und -lagerung

Die Konservierung von Insektenzellen kann auf ähnliche Weise wie bei Säugetierzellen durchgeführt werden.

Kulturen von GRACE's (1962) *Antheraea eucalypti* Zell-Linie sind mehr als 9 Monate lebensfähig geblieben; sowohl bei einer Lagerungstemperatur von  $+4^{\circ}\text{C}$  als auch nach Zugabe von 20% Glycerin zum Kulturmedium bei  $-185^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff (RAHMAN et al., 1966). GRACE (1968) konservierte Zellklone von *Antheraea eucalypti* bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Medium, dem er 10% Glycerin zugegeben hatte. Die Zellen blieben nach 12 Monaten lebensfähig und vermehrten sich weiter. Neben Glycerin kann als Konservierungsmittel bei tiefen Temperaturen auch Dimethylsulfoxid(DMSO) verwendet werden. SCHNEIDER (1969) verwendete zur Konservierung von *Anopheles stephensi* Zellen bei  $-68^{\circ}\text{C}$  sowohl 10% Glycerin als auch 10% DMSO, ohne die Zellen zu schädigen.

## 2. Verwendung von Arthropodenzellkulturen für das Studium der Vermehrung animaler Viren

### 2.1. Historischer Überblick

Da von den ersten Anfängen der in-vitro-Kultivierung (GOLDSCHMIDT, 1915) von Arthropodengeweben bis zum Beginn einer intensiven Entwicklung brauchbarer, reproduzierbarer Methoden mehr als 4 Jahrzehnte vergingen, ist die Verwendung derartiger Kulturen für die Virusforschung bis in die jüngste Zeit auf Einzelaktionen beschränkt gewesen. TRAGER (1938) benutzte als erster Explantatkulturen von Geweben aus Larven und Puppen von *Aedes aegypti* zur Vermehrung von Western Equine Encephalitis-Virus. Das Virus war von infizierten Mäusen gewonnen worden. Nach 28 Tagen war der Titer um das  $10^5$ -fache angestiegen und das geerntete Virus erzeugte in Mäusen und Meerschweinchen die gleiche Erkrankung wie das Ausgangsvirus.

Über 20 Jahre später erst, im Jahre 1959 folgt dann der nächste Bericht von HAINES, der das Eastern Equine Encephalitis-Virus ebenfalls in Kulturen aus Larvengewebe von *Aedes aegypti* zu züchten versuchte. Obwohl die Zellen überlebten, vermehrte sich das Virus nicht.

Mit der Entwicklung besserer Methoden für die Kultivierung von Arthropodenzellen und Geweben, vor allem mit der Etablierung zahlreicher Zell-Linien, erschienen mehr Arbeiten über die Virusvermehrung in diesen Zellsystemen.

Der erste Bericht über das Wachstum eines animalen Virus in einer permanenten Insektenzell-Linie erschien von SUITOR (1966), der GRACE's (1962) *Antheraea eucalypti* - Zellen mit Japanese B Encephalitis-Virus infizierte. Die Virusvermehrung vollzog sich sehr langsam über eine Periode von 3 - 4 Wochen bei  $+28^{\circ}\text{C}$ . Dabei wurden Titer erreicht, die 10 - 100fach höher lagen, als der Infektionstiter. Ein cytopathischer Effekt an den Zellen war nicht zu beobachten. Die langsame Wachstumsrate des Virus in den Zellen könnte mit der niedrigen Bebrütungstemperatur ( $+28^{\circ}\text{C}$ ) zusammenhängen. SUITOR erhielt bei  $+22^{\circ}\text{C}$  kein Viruswachstum.

## 2.2. Virusvermehrung in Primärkulturen

### 2.2.1. Virusvermehrung in Insektenkulturen

Die Versuche zur Vermehrung verschiedener Virusarten in Primärkulturen steht bei Insekten gegenüber den Zell-Linien etwas zurück.

PELEG und TRAGER (1963) berichteten über Kulturen von Imaginalscheiben von *A e d e s a e g y p t i* im "Hängenden Tropfen", die sie mit West Nile-Virus infizierten. Nach 10 - 14 Tagen hatte sich bei +28°C das Virus vermehrt und zeigte mit  $10^{6,5}$  den höchsten Titer. Die Propagierung des West Nile-Virus in Gonadenkulturen von *Ph i l o s o m i a c y n t h i a* (*L e p i d o p t e r a*) gelang jedoch nicht.

PELEG (1968 a) infizierte Primärkulturen von *A e d e s a e g y p t i*, die er aus homogenisierten Embryonen gewonnen hatte, mit Eastern Equine Encephalitis-, Semliki Forest- und West Nile-Virus. Bei +28°C trat bei allen Viren eine Vermehrung auf, die noch 60 Tage p.inf. nachweisbar war. Die Virusreplikation verlief sehr unterschiedlich: West Nile-Virus vermehrte sich am langsamsten und erreichte nach 8 - 10 Tagen den höchsten Titer von  $10^6$  gegenüber etwa  $10^{0,5}$  nach der Virusadsorption. Eastern Equine Encephalitis-Virus hatte nach 4 Tagen mit einem Titer von  $10^7$  gegenüber  $10^1$  nach der Adsorption Höchstitertiter erreicht und West Nile-Virus vermehrte sich am schnellsten wobei Titer von  $10^7$  gegenüber  $10^{1,5}$  nach 2 Tagen erreicht wurden.

Während West Nile-Virus keine cytopathischen Veränderungen bewirkte, konnte nach der Infektion von Eastern Equine Encephalitis- und Semliki Forest-Virus eine Alteration der Zellen beobachtet werden: die Zellen granulierten und vakuolisierten oder degenerierten vollständig.

In Explantatkulturen von Ovarien aus *Culex molestus* propagierten FUJITA et al. (1968) das Japanese B Encephalitis-Virus. Die Virusvermehrung wurde durch Vermehrungskurven und spezifische Immunofluoreszenz im Cytoplasma der infizierten Zellen demonstriert. Daß kein Unterschied in der Vermehrung zwischen Virusausgangsmaterial nach niedrigen und hohen Mäusepassagen feststellbar war, läßt darauf schließen, daß die Virusaffinität für Insektengewebe unabhängig ist von der Adaption des Virus an seinem Nagetierwirt.

Offenbar ist jedoch das Wachstum von Viren auch abhängig von einem bestimmten Zelltyp. HAINES (1959) konnte in Explantaten vom Mitteldarm aus Larven von *Aedes aegypti* das Eastern Equine Encephalitis Virus nicht zur Vermehrung bringen. Später gelang jedoch JOHNSON (1969) die Propagierung dieses Virus in Kulturen von *Aedes aegypti*, die er von zerkleinerten Larven gewonnen hatte.

### 2.2.2. Virusvermehrung in Zeckenzellkulturen

Über die Eignung von Gewebekulturen von Zecken für die Virusvermehrung berichteten zuerst RHACEK und PESEK (1960). Die Autoren infizierten Explantate überlebenden Gewebes, das aus Fettkörper und Hypodermis von *Dermacentor pictus* und *Ixodes ricinus* gewonnen wurde, mit Eastern Equine Encephalitis-Virus. Neben diesen Geweben konnte RHACEK später (1963) auch aus Einzelzellen angezüchtete Zellkulturen für die Virusvermehrung heranziehen. In Zellkulturen aus *Dermacentor marginatus* und *Hyalomma asiaticum* gelang es, Zeckenencephalitis-Virus (Tick Borne Encephalitis) bei +26°C mit einem  $10^1 - 10^4$ fachen Titeranstieg zur Vermehrung zu bringen.

1965 b untersuchte REHACEK in Zellkulturen aus *Hyalomma dromedarii* eine Reihe von Viren der damaligen Arbovirus-Untergruppen A und B. Alle Viren der Gruppe A konnten mit  $10^4$  -  $10^5$  fachem Titeranstieg propagiert werden (Western-, Eastern Equine Encephalitis-, Semliki Forest-, Sindbis-Virus). Die meisten tick-borne-Viren der Untergruppe B vermehrten sich ebenfalls gut in Zeckenzellen, während bei den mosquito-borne-Viren der Gruppe B im Vergleich zu den tick-borne-Viren nur eine geringe Vermehrung beobachtet wurde. Neben diesen Viren waren Versuche zur Propagierung von Säugetier-Viren bis auf eine Ausnahme erfolglos: das Virus der Lymphocytären Choriomeningitis vermehrte sich in Zeckenzellen mit einem Titeranstieg von  $10^4$  -  $10^5$ .

In keinem Fall jedoch ließ sich in diesen Versuchen ein cytopathischer Effekt demonstrieren.

Eine Besonderheit zeigen Zeckenzellen bei Viren von Mammalia bezüglich ihrer Empfänglichkeit. In Primärkulturen von Zecken sind noch Viruskonzentrationen nachweisbar, die nicht mehr ausreichen, Säugetierzellkulturen zu infizieren. Dieser Effekt wurde von REHACEK und KOZUCH (1964) an Primärkulturen von *Hyalomma asiaticum* beobachtet, die mit tick-borne-Encephalitis-Virus infiziert wurden. In diesen Kulturen gingen bei  $+26^{\circ}\text{C}$  noch Infektionen mit 6 mal weniger Virus an, als sie für Zellkulturen von Hühnerembryonen notwendig waren. REHACEK und KOZUCH (1969) nutzten diese Eigenschaft für die Isolierung von tick-borne Encephalitis-Viren aus Nagetierblut und von Zecken. Von 187 getesteten Proben wurden 5 Virusstämme in den Zeckengewebe isoliert.

JUNKER und CORY (1967) konnten Colorado Tick Fever-Virus in Gewebe aus Nymphen von seinem Vektor *Dermacentor andersoni* zur Vermehrung bringen. Der Titeranstieg betrug nach 4 - 5 Wochen bei Inkubationstemperaturen

von  $26^{\circ}$  -  $28^{\circ}\text{C}$  mehr als das  $10^4$ -fache und stieg in 14 Tage alten Kulturen auf das  $10^5$ -fache.

Das Virus war dem Futter zugegeben worden. Infizierte Kontrolltiere zeigten einen signifikant niedrigeren Virus-titer, der von der Infizierung der Tiere bis zur Häutung relativ konstant blieb. Dabei zeigte sich ein Unterschied im Verhalten des Virus in der Zellkultur und in seinem Vektor: von den Zellkulturen dieser Zecken wurde das CTF-Virus für sehr lange Zeit ständig produziert und verlor auch nach 128 Tagen nichts von seiner Virulenz, wie bei den Infektionsversuchen mit Mäusen gezeigt werden konnte. Die Kulturen von *Dermacentor andersoni* waren somit vom Colorado Tick Fever-Virus persistent infiziert worden.

An den Zellen waren keine cytopathischen Veränderungen zu erkennen.

Tabelle 2 Vermehrung verschiedener animaler Virusarten in Primärkulturen von Arthropoden.

Die Virusabkürzungen sind auf Seite 80 erläutert.

Tabelle 2

| Spezies                                                    | Art der Kultur                           | Virus                                      | Resultat                                            | Autor                    |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Aedes aegypti</i>                                       | Explantierte Gewebe von Larven u. Puppen | WEE                                        | 10 <sup>5</sup> -fache Vermehrung                   | TRAGER, 1938             |
| <i>Aedes aegypti</i>                                       | Imaginalscheiben im hängenden Tropfen    | WN                                         | gleichbleibender Titer                              | PELEG und TRAGER 1963    |
| <i>Aedes aegypti</i>                                       | Zellkulturen aus Embryonen               | EEE; WN; SF                                | gleichbleibender Titer                              | PELEG, 1968              |
| <i>Aedes aegypti</i><br><i>Aedes triseriatus</i>           | Gewebestückchen in Suspension            | VEE; EEE                                   | Viruswachstum                                       | JOHNSON, 1969; 1971      |
| <i>Ixodes ricinus</i><br><i>Dermacentor pictus</i>         | Explantierte Fettkörper, Hypodermis      | EEE                                        | 10 <sup>4</sup> -fache Vermehrung                   | REHACEK und PESEK, 1960  |
| <i>Dermacentor marginatus</i><br><i>Hyalomma asiaticum</i> | Zellkulturen aus Nymphen                 | TBE                                        | 10 - 10 <sup>4</sup> -fache Vermehrung              | REHACEK, 1963            |
| <i>Hyalomma asiaticum</i>                                  | Zellkulturen aus Nymphen                 | TBE                                        | empfindlich für sehr kleine Virustiter              | REHACEK und KOZUCH, 1964 |
| <i>Hyalomma dromedarii</i>                                 | Zellkulturen aus Nymphen                 | JBE; SLE; WN; YF; KFD; LGT; LI; OMSK; POW; | 10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup> -fache Vermehrung | REHACEK, 1965            |
|                                                            |                                          | EEE; WEE; SF; SIN; TBE; LI; RSSE; LCM      | 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup> -fache Vermehrung | REHACEK, 1965            |

Fortsetzung Tabelle 2

| Spezies                      | Art der Kultur               | Virus                             | Resultat                                                      | Autor                 |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Hyalomma dromedarii</i>   | Zellkulturen aus Nymphen     | EMC; POL;<br>VSI; VAC;<br>ND; PSU | Keine Virusvermehrung                                         | REHACEK, 1965         |
| <i>Hyalomma dromedarii</i>   | Zellkulturen aus Nymphen     | TRB                               | 10 <sup>4</sup> -fache Vermehrung                             | REHACEK, 1969         |
| <i>Dermacentor Andersoni</i> | Gewebeexplantate aus Nymphen | CTF                               | 10 <sup>5</sup> -fache Vermehrung, persistente Virusinfektion | YUNKER und CORY, 1967 |
| <i>Culex molestus</i>        | Explantate aus Ovarien       | JBE                               | Viruswachstum                                                 | FUJITA et al., 1968   |

## 2.3. Virusvermehrung in permanenten Zell-Linien

### 2.3.1. *Antheraea eucalypti*-Linie

SUITOR (1966) benutzte für die Virusstudien *Antheraea eucalypti*-Zellen von GRACE (1962), die er mit Hämolymphe einer verwandten Mottenart kultiviert hatte. Jedoch konnte SUITOR nur eine Vermehrung des Japanese B Encephalitis Virus (JBE) beobachten, wenn Hämolymphe zugegeben wurde. Daraus schloß er, daß das Wachstum des JBE-Virus vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig ist. Das Wachstum des JBE neben einer Reihe anderer Viren in GRACE's *Antheraea eucalypti* Zell-Linie demonstrierten später YUNKER und CORY (1968) erneut. Dagegen scheiterten Versuche, Viren damaliger Arbovirus-Untergruppen A und C und das Tacaribe-Virus zur Vermehrung zu bringen. Darüber hinaus ließen sich tick-borne Viren in den *Antheraea*-Zellen nicht propagieren. *Antheraea*-Zellen waren jedoch für diese Versuche an ein Medium ohne Hämolymphe adaptiert.

Die Fähigkeit der *Antheraea*-Zell-Linie zur Vermehrung bestimmter Virusarten scheint als selektives System für die Virusdifferenzierung herangezogen werden zu können (YUNKER, 1971). Offenbar besitzen auch hier wie bei Primärkulturen von *Aedes aegypti*, morphologisch unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Fähigkeiten für die Virusvermehrung (YUNKER und CORY, 1968).

CONVERSE und NAGLE (1967) züchteten in *Antheraea*-Zellen, die ebenfalls an ein Hämolymphe-freies Medium adaptiert waren, Yellow Fever Virus und YANG et al. (1969) vermehrten wie vorher YUNKER und CORY (1968) das Virus der Vesikulären Stomatitis in der Zell-Linie.

Darüber hinaus demonstrierten die Autoren mit spezifischem Antiserum, daß das Vorhandensein von infektiösem Virus in den Zellen tatsächlich auf eine Virusneusynthese zurückzuführen war.

In allen Fällen trat nach Infektion von *Antheraea*-Zellen kein cytopathischer Effekt auf.

Tabelle 3 Vermehrung verschiedener animaler Virusarten in der *Antheraea eucalypti*-Zell-Linie (GRACE, 1962).

Die Virusabkürzungen sind auf Seite 80 erläutert.

| Virus                                                                                                       | Ergebnis                              | Autor                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| JBE                                                                                                         | 10 - 100-fache Vermehrung             | SUITOR (1966)             |
| YF                                                                                                          | $10^2$ - $10^3$ -fache Vermehrung     | CONVERSE und NAGLE (1967) |
| CV; JBE; SLE; VSI; YF                                                                                       | $10^{3,7}$ - $10^6$ -fache Vermehrung | YUNKER und CORY (1968)    |
| BUN; CE; SH; TAH                                                                                            | gleichbleibender Titer                | YUNKER und CORY (1968)    |
| CNU; CHIK; CTF; EEE; EMC; HS; ITQ; JUN; LGT; MTB; MET; MOD; NYM; PHL; POW; PSU; QRF; RB; TCR; TUR; WEE; MAC | keine Vermehrung nachweisbar          | YUNKER und CORY (1968)    |
| VSI                                                                                                         | $10^3$ -fache Vermehrung              | YANG et al., (1969)       |
| JUN; TAC                                                                                                    | keine Vermehrung nachweisbar          | HANN und CLARK (1971)     |

### 2.3.2. Aedes Zell-Linien

#### 2.3.2.1. Aedes aegypti

Die permanenten Zell-Linien von GRACE (1966), SINGH (1967) und PELEG (1969 b) sind, hinsichtlich der möglichen Vektorrolle von Stechmücken, sofort nach ihrer Etablierung für Virusstudien herangezogen worden, wobei SINGH's bzw. PELEG's Linie besser geeignet war, weil die Zellen im Gegensatz zu GRACE's Linie für ihr Wachstum keine Hämolymphe benötigten. Außer in *Antheraea eucalypti* konnten CONVERSE und KESLE (1967) das Yellow Fever-virus auch in GRACE's *Aedes aegypti*-Linie vermehren. Auch bereits berichtet REHACEK (1968 a, b, 1969) über die Kultivierung von 4 Viren, die ebenfalls der Gruppe B zugeordnet waren: Japanese B Encephalitis-, Murray Valley Encephalitis- und Singapore S. Encephalitis-Viren. Die Insekten als Vektoren dieser Viren der Gruppe B und drei der Gruppe A, ebenfalls Viren mit Insekten als Vektoren, ließen sich jedoch nicht propagieren.

Bei der Infektion der Zellen mit Murray Valley Encephalitis- und Japanese B Encephalitis-Virus beobachtete REHACEK (1968 b) eine persistente Virusinfektion; nach 21 in-vitro-Passagen verloren diese Viren jedoch ihre Infektiosität.

Die Virusvermehrung erfolgte ohne Ausbildung eines cytopathischen Effektes.

FILSHI und REHACEK (1968) beschreiben dagegen das Auftreten von Degenerationerscheinungen in GRACE's *Aedes aegypti*-Zellen nach der Infektion mit Japanese B Encephalitis-Virus. In SINGH's *Aedes aegypti*-Zell-Linie ließen sich West Nile-, Chikungunya- und Chandipura-Virus kultivieren. (SINGH und PAUL, 1968). Jedoch war sie nicht empfänglich gegenüber

einer ganzen Reihe anderer Viren wie Chittoor (Batai)-, Dengue-, Ganjam-, Japanese B Encephalitis-, Sathuperie- und Sindbis-Virus, die sich gut in *Aedes albopictus* - Zellen vermehrten (Tabelle 4).

BUCKLEY (1969) propagierte 7 weitere Viren in *Aedes* - Zell-Linien (Tabelle 4 und 5), alles mosquito borne-Viren, darunter das Virus der Vesikulären Stomatitis. VS vermehrte sich in diesen Zellen mit einem höheren Infektionstiter als in *Aedes albopictus* - Zellen. Andere Viren der verschiedensten Gruppen, einschließlich der tick borne-Viren, ließen sich nicht vermehren.

PELEG (1968 b) erreichte in seiner Zell-Linie neben der Replikation von West Nile-Virus auch die Kultivierung von Eastern Equine Encephalitis-Virus und Semliki Forest-Virus, die in GRACE's Zell-Linie nicht gewachsen waren. Der Autor infizierte (1969 a) außerdem seine Zellen mit RNS, die aus Semliki Forest- und West Nile-Virus gewonnen worden war sowie mit RNS von Encephalomyocarditis-Virus und Poliovirus. Im Gegensatz zur Neubildung infektiöser Viruspartikel, die sich in Insektenkulturen vermehren lassen, ist es zu keinerlei Vermehrung der Picornaviren gekommen.

PELEG (1969 b) beschrieb darüber hinaus eine persistente Virusinfektion in seiner *Aedes aegypti* - Zell-Linie mit Semliki Forest-Virus und zeigte, daß sich das Virus nur in einem sehr kleinen Anteil der gesamten Zellpopulation vermehrte. Ein cytopathischer Effekt war nicht zu beobachten. Auch als die Zellen gleichzeitig mit Western Equine Encephalitis- und Semliki Forest-Virus infiziert wurden, blieb der cytopathische Effekt aus. Beide Viren vermehrten sich in der Zell-Linie, es traten jedoch keine Doppelinfektionen von Einzelzellen auf (PELEG, 1971 a).

In den verschiedenen *A e d e s a e g y p t i* - Linien sind die Zellen für bestimmte Viren unterschiedlich empfänglich. Das Semliki Forest-Virus vermehrt sich zwar in PELEG's Zell-Linie (PELEG, 1969 b), jedoch nicht in GRACE's Zell-Linie (REHACEK, 1968 a). Während das Japanese B Encephalitis-Virus in GRACE's Zell-Linie vermehrt werden konnte (REHACEK, 1968 b), ließ sich keine Replikation in SINGH's Zell-Linie beobachten (SINGH und PAUL, 1968 a, b). Offenbar sind auch hier bestimmte Zelltypen in den Zell-Linien verschieden empfänglich für die Vermehrung einiger Virusarten.

Die Tatsache, daß einige Rasse von Vertebratenzell-Kulturen wegen Kontamination mit pathogenen Viren für die Produktion von Vaccinen unbrauchbar sind, veranlaßte PELEG (1971) zu dem Versuch, Semliki Forest-Virus an die Zellen seiner *A e d e s a e g y p t i* - Linie zu attenuieren. PELEG fand, daß diese Zellen frei von Kontaminationen waren und somit geeignet für die Vaccine-Herstellung. Nach 20 Kulturpassagen hatte das Semliki Forest-Virus seine Virulenz verloren, was er an adulten Hamstern und Mäusen zeigen konnte. Die Versuche, ebenfalls Japanese B Encephalitis- und West Nile Virus an die *A e d e s a e g y p t i* - Zellen zu attenuieren, schlugen fehl. Nach 47 bzw. 62 Kulturpassagen hatten die Viren nichts von ihrer Virulenz eingebüßt.

Tabelle 4 Virusvermehrung verschiedener animaler Virusarten in den *A e d e s a e g y p t i* - Zell-Linien, (GRACE, 1966; SINGH, 1967; PELEG, 1969 a.)

Die Virusabkürzungen sind auf Seite 80 erläutert.

Tabelle 4

| Virus                                                            | Zell-Linie | Ergebnis                                                               | Autor                    |
|------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| YF                                                               | GRACE      | $10^2 - 10^3$ -fache Vermehrung                                        | CONVERSE und NAGLE, 1967 |
| JBE; MVE                                                         | GRACE      | Persistente Virusinfektion                                             | REHACEK, 1968 b          |
| JBE; MVE                                                         | GRACE      | Virus im Endoplasmatischen Retikulum nachweisbar, Zellen degenerierten | REHACEK, 1968 b          |
| BEB; EH; KOK; SF; SIN                                            | GRACE      | Keine Vermehrung nachweisbar                                           | REHACEK, 1968 a          |
| CHIP; CHIK; WN                                                   | SINGH      | Virusvermehrung                                                        | SINGH und PAUL 1968 a, b |
| CHIT; COX; DEN; DHO; EMC; GAN; MHE; JBE; KFD; KSO; POL; SAT; SIN | SINGH      | Keine Virusvermehrung nachweisbar                                      | SINGH und PAUL 1968 a, b |
| CHIK; EEE; SF; SLE; VEE; VSI; VSNJ; WN; YF                       | SINGH      | Virusvermehrung                                                        | BUCKLEY, 1969            |
| BAND; CNU; CR; CTF; C5581                                        | SINGH      | Keine Virusvermehrung nachweisbar                                      | BUCKLEY, 1969            |
| SIN                                                              | SINGH      | Virusvermehrung                                                        | STEVENS, 1970            |
| EEE; SF; WN                                                      | PELEG      | Virusvermehrung                                                        | PELEG, 1968 b            |
| SF; WN; (RNS)                                                    | PELEG      | Neubildung infektiöser Viruspartikel                                   | PELEG, 1969 a            |
| EMC; POL; (RNS)                                                  | PELEG      | RNS nicht infektiös                                                    | PELEG, 1969 a            |
| SF                                                               | PELEG      | Persistente Virusinfektion, nur wenige Zellen infiziert                | PELEG, 1969 b            |

Fortsetzung Tabelle 4

| Virus   | Zell-Linie | Ergebnis                                                                                | Autor         |
|---------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| EEE; SF | PELEG      | Vermehrung beider Viren in der Zell-Linie jedoch keine Doppelinfektion einzelner Zellen | PELEG, 1971 a |
| SF      | PELEG      | Virusattenuierung, Möglichkeit zur Vaccine-Herstellung                                  | PELEG, 1971 b |
| JBE; WN | PELEG      | Virusattenuierung war nicht möglich                                                     | PELEG, 1971 b |

2.3.2.2. Aedes albopictus

Schon kurz nach der Etablierung der Zell-Linie (1967) gingen SINGH und PAUL (1968 a,b) wie bei *Aedes aegypti* an die Untersuchung der Replikation verschiedener Viren in SINGH's *Aedes albopictus* - Zell-Linie. Dabei beobachteten die Autoren nicht nur eine Virusvermehrung, sondern sie stellten auch einen durch Japanese B Encephalitis-, West Nile- und Dengue 1, 2 und 4-Virus hervorgerufenen cytopathischen Effekt fest. Darüber hinaus erhielten sie die Vermehrung einer Reihe anderer Viren, die sich ohne Ausbildung cytopathischer Effekte vollzog und unter denen sich Viren wie Chittoor (Batai), Ganjam, Sathuperi und Sindbis befanden, die sich in SINGH's *Aedes aegypti* - Linie nicht vermehrt hatten (SINGH und PAUL, 1968 a,b). Säugetierviren wie Coxsackie B 5, Encephalomyocarditis oder Polio ließen sich wie in den *Aedes aegypti* - Zellen nicht zur Vermehrung bringen. Ebenso mißlang in beiden *Aedes* - Zell-Linien die Vermehrung der tick-borne-Viren Kyasanur Forest Disease, Kaisodi und Dhori.

BANERJEE und SINGH (1968) erhielten durch Chikungunya-, West Nile- und Japanese B Encephalitis-Virus hervorgerufene

persistente Virusinfektionen, wenn nach der Infektion von *Aedes albopictus* - Zellen mit diesen Viren ein cytopathischer Effekt nicht auftrat. Dabei wurde im Falle des Chikungunya-Virus eine Abschwächung der Virulenz an Mäusen nach wenigen Zellkulturpassagen festgestellt (BANERJEE und SINGH, 1969).

PAUL und SINGH (1969) wiederum konnten zeigen, daß alle 4 Serotypen von Dengue-Virus, die entweder aus menschlichem Serum oder von Moskito-Infektionen isoliert worden waren in der *Aedes albopictus* - Linie einen cytopathischen Effekt erzeugten, dessen Morphologie für ihre Differenzierung herangezogen werden konnte. Die Hauptcharakteristika dieses cytopathischen Effektes, der ja auch von Japanese B Encephalitis- und West Nile-Virus hervorgerufen wurde, sind (1) Zell-Lysis einzelner kleiner Zellen, (2) Syncytienbildung, (3) allmähliche Zunahme von vielkernigen Riesenzellen, (4) aktive Phagocytose von toten oder sterbenden Zellen und (5) Erholung und Wiedergewinnung der infizierten Kulturen (SINGH, 1971).

YUNKER und CORY (1968 b) berichteten über ihre Ergebnisse bei der Infektion der *Aedes albopictus* - Zell-Linie mit Viren der früheren Arbovirus-Gruppe B. Obgleich sie Japanese B Encephalitis-, St. Louis Encephalitis- und West Nile-Virus in diesen Zellen zur Vermehrung brachten, traten keine cytopathischen Effekte auf.

BUCKLEY (1969 a) erzielte die Vermehrung von 7 mosquito-borne-Viren der Gruppen A und B und des Virus der Vesikulären Stomatitis. Außerdem gelang wie bei YUNKER und CORY (1969) die Propagierung von Colorado Tick Fever-Virus. Damit konnte gezeigt werden, daß die von SINGH und PAUL (1968 a,b) postulierte Verallgemeinerung, tick-borne-Viren könnten nicht in der *Aedes albopictus* - Linie vermehrt werden, korrigiert werden mußte.

Ein cytopathischer Effekt konnte nur bei der Vermehrung von West-Nile-Virus beobachtet werden.

Die Ausbildung eines cytopathischen Effektes in der *Aedes albopictus* - Zell-Linie durch verschiedene mosquito borne-Viren wurde von SUITOR (1969) für die Entwicklung einer Plaque-Methode ausgenutzt. Die Plaquetiter waren reproduzierbar und direkt proportional dem Virusgehalt.

Tabelle 5 Vermehrung verschiedener animaler Virusarten in der *Aedes albopictus* - Zell-Linie (SINGH, 1967.)

Die Virusabkürzungen sind auf Seite 80 erläutert.

| Virus                                                          | Ergebnis                                                                                                                               | Autor                       |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| AHS; CHP; CHIK;<br>CHIT; DEN 1-4;<br>GAN; JBE; SAT;<br>SIN; WN | Virusvermehrung, CPE mit<br>JBE; WN; DEN -1,2,3,4                                                                                      | SINGH und PAUL<br>1968 a, b |
| COX; DHO; EMC;<br>MHE; KFD; KSO;<br>POL                        | keine Virusvermehrung<br>nachweisbar                                                                                                   | SINGH und PAUL<br>1968 a, b |
| CHIK; JBE; WN                                                  | Anfänglich CPE mit JBE<br>und WN, wenn nicht,<br>dann persistente Virus-<br>infektion                                                  | BANERJEE und SINGH<br>1968  |
| CHIK; JBE; WN;<br>DEN-2                                        | Zellen hochempfindlich<br>für die Infektion                                                                                            | PAUL und SINGH<br>1968      |
| CHIK, JBE; WN;<br>DEN-2                                        | CPE, Bildung von<br>Syncytien                                                                                                          | PAUL et al., 1969           |
| DEN 1-4                                                        | Primärisolierung von<br>Blut und Moskitos;<br>Identifizierung nach<br>Komplement-Bindungs-<br>Reaktion von Zellkultur-<br>medium (KBR) | SINGH und PAUL,<br>1969     |

Fortsetzung Tabelle 5

| Virus                                           | Ergebnis                                                                                | Autor                        |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| DEN-1                                           | Isoliert von Humanblut, Identifizierung mit Komplementbindungsreaktion von Kulturmedien | PAVRI und GOSH, 1969         |
| DEN-2                                           | Syncytienbildung durch Plastikkulturflasche erhöht                                      | SUITOR, 1969                 |
| JBE; SLE; WN; CTF                               | Vermehrung, aber kein CPE                                                               | YUNKER und CORY 1968 b, 1969 |
| LGT; POW                                        | Keine Virusvermehrung nachweisbar                                                       | YUNKER und Cory 1968 b       |
| SIN; DEN-2                                      | Persistente Virusinfektion mit SIN; Virusvermehrung von DEN-2                           | STEVENS, 1970                |
| JBE                                             | Plauebildung                                                                            | SUITOR und PAUL, 1971        |
| CHIK; CTF; EEE; SF; SLE; VEE; CSI; VSNJ; WN; YF | Viruswachstum, jedoch CPE nur mit WN                                                    | BUCKLEY, 1969                |
| CHIK; ONN                                       | Kein CPE, Virusvermehrung                                                               | BUCKLEY, 1971                |
| CE                                              | Persistente Virusinfektion                                                              | WHITNEY und DEIBEL 1971      |

2.3.3. Culex quinquefasciatus-Linie

HSU (1971) beschrieb die Entwicklung einer Zell-Linie aus explantierten Ovarienstückchen von *Culex quinquefasciatus* (Say) und ihre Verwendung für Virusstudien. Er infizierte Kulturen mit Viren der früheren Arbovirus-Gruppe A (Eastern Equine Encephalitis-, Sindbis-, Sagiya-Virus), der Gruppe B (Japanese B Encephalitis, Murray Valley Encephalitis, West Nile, Dengue 2 und 4) und mit Bunyamwera-Virus. Bis auf Eastern Equine Encephalitis- und Sindbis-Virus vermehrten sich alle Viren, wobei Japanese B Encephalitis- und West Nile-Virus mit  $10^{4,9}$  bzw.  $10^{3,6}$ -facher Vermehrung

die stärkste Vermehrung zeigten. Bei den meisten Viren war nach etwa 4 Tagen der Höchstititer erreicht. Die geringste Zunahme der Viruskonzentration war bei Murray Valley Encephalitis- und Dengue-4-Virus mit jeweils  $10^{1,5}$ -facher Vermehrung zu beobachten.

#### 2.3.4. Drosophila melanogaster-Linie

HANNOUN und ECHALIER (1971) verwendeten erfolgreich die *Drosophila melanogaster*-Zell-Linie (ECHALIER und OHANESSIAN, 1969) für die Propagierung einer Reihe von Viren. Die Autoren infizierten die Kulturen mit Chikungunya-, Sindbis-, Dengue -1,2,3,4-, Yellow Fever-, St. Louis Encephalitis-, West Nile-, Japanese Encephalitis-, Central European Encephalitis- sowie mit Tahyna-, Ilesha- und Sandfly Fever-Virus. Im Gegensatz zu der *Culex quinquefasciatus*-Linie vermehrten sich Chikungunya- und Sindbis-Viren sehr gut und erreichten hohe Titer. Unter den Viren der B-Gruppe vermehrte sich das West Nile Virus sehr gut. Die Infizierung der Zellen mit Dengue-2- und Tahyna-Virus führte zu persistenten Infektionen.

Erläuterungen der Virusabkürzungen

|         |                               |
|---------|-------------------------------|
| AHS     | African Horse Sickness        |
| BAND    | Bandia                        |
| BEB     | Bebaru                        |
| BUN     | Bun <sup>†</sup> amwera       |
| CE      | California BFS-283            |
| CEE     | Central European Encephalitis |
| CHP     | Chandipura                    |
| CNU     | Chenuda                       |
| CHIK    | Chikungunya                   |
| CHIT    | Chittoor (Batai)              |
| COX     | Coxsackie B 5                 |
| CR      | Cowbone Ridge                 |
| CTF     | Colorado Tick Fever           |
| C 5581  | tick-borne, ohne Namen        |
| DEN-1-4 | Dengue-1,2,3,4                |
| DHO     | Dhori                         |
| EEE     | Eastern Equine Encephalitis   |
| EH      | Edge Hill                     |
| EMC     | Encephalomyocarditis          |
| GAN     | Ganjam                        |
| MHE     | Mouse Hepatoencephalomyelitis |
| JBE     | Japanese B Encephalitis       |
| KFD     | Kyasanur Forest Disease       |
| KOK     | Kokoberra                     |
| KSO     | Kaisodi                       |
| LGT     | Langat                        |
| LCM     | Lymphocytäre Choriomeningitis |
| LI      | Louping Ill                   |
| MVE     | Murray Valley Encephalitis    |
| ND      | Newcastle's Disease           |
| OMSK    | Omsk Hemorrhagic Fever        |
| ONN     | O'nyong-nyong                 |
| POL     | Poliovirus                    |

Fortsetzung: Erläuterung der Virusabkürzungen

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| POW  | Powassen                           |
| PSU  | Pseudorabies                       |
| RSSE | Russian Spring-Summer Enceph.      |
| SAG  | Sagiyama                           |
| SAT  | Sathuperi                          |
| SF   | Semliki Forest                     |
| SIN  | Sindbis                            |
| SLE  | St. Louis Encephalitis             |
| TBE  | Tick-borne Encephalitis            |
| TRB  | Tribec                             |
| VAC  | Vaccinia                           |
| VEE  | Venezuelan Equine Encephalitis     |
| VSJ  | Vesikuläre Stomatitis (Indiana)    |
| VSNJ | Vesikuläre Stomatitis (New Jersey) |
| WEE  | Western Equine Encephalitis        |
| WN   | West Nile                          |
| YF   | Yellow Fever                       |

## C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 1. Material und Methoden

#### 1.1. Verwendung und Zusammenstellung geeigneter Kulturmedien.

Für die Anzüchtung von Geweben aus *Leucophaea maderae* wurden MARKS' Kulturmedien M-18 (GIBCO), GRACE's Insektenkulturmedium GMA (GRACE, 1962), LANDUREAU's Kulturmedium (LANDUREAU, 1966; 1968) und das M-M Medium (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964) auf ihre Eignung getestet. Alle Medien sind im Institut zusammengestellt worden. Das Rezept für die Herstellung des M-18-Mediums ist angefordert worden (Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y. 14072). Dem Medium wurde 10% hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei +56°C) fötales Kälberserum zugesetzt.

Außer diesen Medien wurde ein spezielles *L. maderae*-Kulturmedium (M-Lm) entwickelt. Die quantitative und qualitative Bestimmung der einzelnen Bestandteile dieses Mediums erfolgte durch Analysen der Hämolymphe von *L. maderae*.

#### 1.1.1. Gewinnung von Hämolymphe

Etwa 100 Larven der 3 letzten Larvenstadien dienten der Entnahme von Hämolymphe, so daß ein Gemisch der verschiedensten Stadien innerhalb des Häutungszyklus vorlag. Die Tiere wurden 2 Tage lang ausschließlich mit Äpfeln gefüttert, um die Hämolymphe-Ausbeute zu erhöhen. Die Betäubung der Larven und die Entnahme von Hämolymphe erfolgte bei +4°C. Nach Abtrennung von jeweils einem Bein zwischen Trochanter und Femur wurde die Hämolymphe durch leichten Druck auf Thorax und Abdomen aus der Wunde herausgepreßt und in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die so von allen Larven gesammelte Hämolymphe wurde dann bei 10.000 Upm (SPINCO L4, Beckman München) 30 Minuten lang zentrifugiert (+4°C). Die Ausbeute an klarem, weiß bis gelblichen Überstand betrug ca. 6 ml. Der Überstand wurde zu je 1 ml abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

### 1.1.2. Analysen von Hämolymphe

#### 1.1.2.1. Kationen und Anionen

Die Magnesiumbestimmung erfolgte mit einem Flammenspektrophotometer (ZEISS).

Methodik: die verdünnte und dann zerstäubte Hämolymphe wird in eine Acetylenflamme zur Bildung von Magnesiumatomen aus Molekülen und Ionen geblasen. Von einer Hohlkathodenlampe wird Licht mit einer Wellenlänge von 285 nm erzeugt. Die Intensitätsdifferenz der Absorption dieses Lichtes durch die Magnesiumatome ist ein Maß für die Magnesiumkonzentration in der Hämolymphe.

Die Vergleichslösungen enthielten Mg-Konzentrationen zwischen 0,25 und 1,0 mg/l. Die Hämolymphe wurde so verdünnt, daß ihre Mg-Konzentration in diesem Meßbereich lag. Zur Ausschaltung von Störfaktoren wurde ein 2,5%iger  $\text{SrNO}_3$ -Puffer verwendet.

Für die Calciumbestimmung wurde das Calcium mit Chloranilsäure (2,5-Dichlor-3,6-Dihydroxyparabenzochinon) als Ca-Cl-Anilat gefällt. Der Niederschlag wurde mit 50%igem Isopropylalkohol gewaschen und in einer  $\text{FeCl}_3$ -Lösung gelöst. Die Farbintensität des sich dabei bildenden rotvioletten Fe-Chloranil-Komplexes (Wellenlänge 546 nm) ist ein Maß für die Ca-Konzentration. Sie ist mit einem EPPENDORF-Filterfotometer bestimmt worden. Die Standardlösung enthielt 10 mg Ca/100 ml, die Meßbereichsverdünnung lag zwischen 3 und 10 mg/100 ml.

Die Bestimmung des Gehaltes von Natrium und Kalium wurde mit einem EPPENDORF-Flammenphotometer durchgeführt. Nach Zerstäuben der verdünnten Hämolymphe wurden die Atome und Moleküle der Alkalimetalle in der Flamme zur Lichtemission angeregt. Aus der Intensität der Atomlinien oder Molekülbanden von Natrium und Kalium ließ

sich die Konzentration nach Ausfiltern des Lichtes im Filtergerät bei 589 nm bzw. 768 nm bestimmen. Die Hämolymphe-Proben wurden so verdünnt, daß der jeweilige Metallgehalt höchstens 10 ppm betrug. Die Messung des Metallgehaltes wurde gegen eine Vergleichslösung von 10 mg Na/l + 10 mg K/l (MERCK) durchgeführt.

Zur Ausschaltung von gegenseitiger Anregungsbeeinflussung und Querempfindlichkeiten, d.h. der Erhöhung des Meßwertes durch von Begleitelementen bedingte Strahlung, wurde ein  $\text{CsCl}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ -Puffer verwendet (SCHUHKNECHT und SCHINKEL, 1963).<sup>1)</sup>

Der Gehalt an Chloridionen wurde potentiometrisch mit  $\text{AgNO}_3$  von einem automatischen Titriergerät (Autotitrator "Radiometer", Kopenhagen) bestimmt.

Die quantitative Bestimmung der Phosphationen wurde photometrisch nach der Mikrolitermethode bestimmt: nach Umwandlung des anorganischen Phosphates mit Ammoniummolybdat wird die gebildete Phosphormolybdänsäure mit Amidol zu Molybdänblau reduziert. Dieses bleibt kolloidal gelöst, die Intensität der Färbung ist dem Phosphorsäuregehalt proportional. Die Bestimmung selbst erfolgte in einem EPPENDORF-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 691 nm.<sup>2)</sup>

-----  
1) Herrn Dr. E. BOEHNKE (Tierärztliche Fakultät der Universität München) bin ich für die freundlich gewährte Hilfe bei der Bestimmung der Kationen außerordentlich dankbar.

2) Für die Durchführung der Anionenbestimmung bin ich Herrn Dr. Dr. W. STAMM (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) sehr zu Dank verpflichtet.

#### 1.1.2.2. Zucker

Die Bestimmung der Zucker wurde gaschromatographisch durchgeführt. Die Zucker wurden hierfür in Trimethylsilyl-Derivate überführt (SWEETLEY et al., 1963) und in einem 7620a Hewlett Packard-Gaschromatographen bestimmt (6 Fuß-Säule, 10% Silikongummi auf Chromosorp W, UCCW) <sup>3)</sup>

#### 1.1.2.3. Aminosäuren

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung wurde die Hämolymphe mit Natriumcitratpuffer auf 1:40 verdünnt. Die Auftrennung der einzelnen Aminosäuren ist mit einem automatisch arbeitenden Aminosäureanalysator (Beckmann, "Unichrom") durchgeführt worden. Die Extinktionsmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 570 nm (Prolin 440 nm). Da zunächst für Threonin und Glutamin keine getrennten Peaks auftraten, sind nach Proteinfällung der Hämolymphe die Proben dann hydrolysiert (Glutamin → Glutaminsäure) worden. Nach einem weiteren Analysenlauf konnten aus der Differenz die Werte für Glutamin und Threonin einzeln bestimmt werden. <sup>4)</sup>

#### 1.2. Technik der Kultivierung von Zellen und Geweben in vitro

Zur Züchtung von Geweben ist die Schabe *Leucophaea maderae* Fab. (*Blattaria*) verwendet worden. Adulte Tiere und Larven in den verschiedensten Entwicklungsstadien wurden getrennt in Plastikkulturkästen bei einer Umgebungstemperatur von

-----  
3) Herrn Prof. Dr. H. REMBOLD (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München) bin ich für die Zuckerbestimmungen großen Dank schuldig.

4) Herrn STANGEL (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München) möchte ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen herzlich danken.

+28°C gehalten. Als Futtermittel dienten sowohl Äpfel als auch Meerschweinchen-Pellets (Fa. ALTROMIN). Frisch geschlüpfte Larven wurden regelmäßig von den Kästen mit den adulten Tieren entfernt und separat weitergezüchtet. Befruchtete Weibchen sind entsprechend der Entwicklung der Eikokons ebenfalls separiert worden.

#### 1.2.1. Auswahl der Tiere für die Gewinnung von Geweben

##### 1.2.1.1. Embryonen

Als Gewebesponder dienten ausdifferenzierte Embryonen: die Eikokons sind weiß bis gelblich, bei den paarig angeordneten Embryonen sind die Augenanlagen als schwarze Flecken deutlich erkennbar. In stark ausdifferenziertem Zustand sind bereits innere Strukturen wie der grau-schwarz durchscheinende Darmtrakt zu sehen. Die Außenhaut des Eikokons erscheint lederartig.

##### 1.2.1.2. Larven

Zur Gewinnung von Geweben sind neben Embryonen Larven des vorletzten bis letzten Larvenstadiums herangezogen worden. Sie sind durch ihre Größe und durch die starke Ausbildung der Flügelscheiden leicht zu erkennen. Für die Gewinnung von Regenerationsgewebe wurden Larven bis zu 2 Tagen nach der Häutung ausgesucht: direkt nach der Häutung sind die Larven weiß, die Pigmentierung setzt erst nach 2 - 3 Stunden ein. In diesem Stadium lassen sie sich mit ihrer grauen bis grauschwarzen Farbe von den übrigen Larven dunkelbrauner Farbe gut abgrenzen.

Das Abdomen ist flacher und ovaler gegenüber den ellipsoiden Formen der anderen.

Für die Entnahme der Gewebe wurden die Larven durch Auskühlung bei +4°C während einer Dauer von 2 Stunden betäubt.

Dann erfolgte die Abtrennung der beiden Metathoraxbeine und eines Mesothoraxbeins zwischen Trochanter und Femur. Für die Bildung der Beinregenerate sind die Larven bei +28°C 21 Tage lang inkubiert worden. Zur Gewinnung von Hämocyten wurden Larven zu verschiedenen Zeitpunkten des Häutungszyklus herangezogen.

### 1.2.2. Präparation der Gewebe

#### 1.2.2.1. Embryonen

Adulte Weibchen mit ausdifferenzierten Embryonen wurden zunächst mit CO<sub>2</sub> betäubt und dann mit PBS (Phosphate Buffered Saline; DULBECCO und VOGT, 1954) gewaschen, um grobe Verunreinigungen des Abdomen zu entfernen (bei der Betäubung mit CO<sub>2</sub> geben die Tiere Kot ab). Die Eikokons sind dann aus der Geschlechtsöffnung herausgepreßt und auf ein Filterpapier aufgefangen worden. Wegen der Kontaminationsgefahr am Rectum wurden die Eikokons in einer Lösung aus 0,1%igem Hyamin-1622 (SERVA) 5 Minuten desinfiziert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Mit feinen, sterilen Pinzetten wurden die Embryonen nach Entfernen der Kokonhülle einzeln herauspräpariert und in einer Petrischale mit etwas PBS gesammelt.

#### 1.2.2.2. Larven

Für die Gewinnung von Hämocyten wurden Larven verschiedener Häutungsstadien der Zucht entnommen. Die Betäubung der Tiere erfolgte über 2 Stunden bei +4°C. Anschließend erfolgte die Entnahme von Hämolymphe nach Amputation eines Metathoraxbeines je Larve zwischen Trochanter und Femur. Die aus der Wunde tropfende Hämolymphe wurde direkt in Kulturmedium aufgefangen.

Zur Präparation der Beinregenerate wurde der Regenerationsprozess nach 21 Tagen unterbrochen. Die Betäubung der Larven

erfolgte mit  $\text{CO}_2$ . Mit einer feinen Schere wurden die Coxen mit den Regeneraten an der Basis abgetrennt und in einer Petrischale mit PBS gesammelt und einmal gewaschen.

Die Säuberung und Desinfektion der Oberfläche erfolgte zunächst mit 70%igem Äthanol für 1 Minute und anschließend dem zweifachen Waschen in PBS. Anschließend wurden die Coxen mit einer 3%igen Natriumhypochloritlösung für 10 Minuten behandelt. Nach fünf weiteren Waschungen in PBS wurden die Coxen einzeln unter einem Zeiss-Präparationsmikroskop bei 6-facher Lupenvergrößerung mit feinen Pinzetten an der Chitin-Nahtstelle geöffnet und die Gewebe herauspräpariert. Die den Desinfektionsmaßnahmen ausgesetzten Gewebeanteile an der Schnittfläche sind so weit wie möglich zurückgelassen worden. Alle Gewebestückchen wurden in einer Petrischale mit einer kleinen Menge PBS gesammelt.

### 1.2.3. Aufschließen der Gewebe

#### 1.2.3.1. Gewebeexplantation

Das aus der Coxa präparierte Regenerationsgewebe wurde mit einer Irisschere in ca.  $0,5 \text{ mm}^3$  kleine Stückchen geschnitten und in Kulturmedium gewaschen. Anließend erfolgte die Explantation der Gewebestückchen entweder einzeln im "Hängenden Tropfen" oder mehrere Stückchen wurden zusammen mit Kulturmedium gleichzeitig in das Kulturgefäß überführt.

#### 1.2.3.2. Enzymatische Spaltung

2 - 5 g Embryonen und 1,5 - 3 g Coxagewebe wurden mit einer Irisschere in feine Stückchen geschnitten und nach Zerkleinerung einmal mit PBS gewaschen. Für die enzymatische Spaltung der Gewebe sind jeweils 50 ml einer Lösung aus

0,25% Trypsin (DIFCO 1:250) in PBS verwendet worden. Die Trypsinierung erfolgte bei  $+37^{\circ}\text{C}$ . Nach 20minütiger Trypsinierung wurde die Trypsin-Zell-Suspension durch einen 4-fachen Gazefilter gegossen und dann 5 Minuten bei 250·g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes ist das Zellsediment in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert worden. Der Trypsinierungsvorgang wurde wiederholt und die entstandenen 2 Fraktionen wurden gepoolt.

#### 1.2.4. Kulturgefäße.

Für die Kultivierung von Regenerationsstückchen im "Hängenden Tropfen" sind selbst gefertigte Kulturkammern verwendet worden. Auf einem entfetteten Objektträger wurden Zylinderringe aus Polystyrol von 25 mm Durchmesser, einer Wandstärke von 3 mm und einer Höhe von 7 mm aufgeklebt (2-Komponentenklebstoff Stabilyt Express). Auf die Ringfläche wurde Vaseline aufgetragen. Die Sterilisierung der Kammer erfolgte mit UV-Licht.

Für die Zellsuspension wurden Zellkulturröhrchen (1,5 ml), Leighton-tubes (0,3 und 1,5 ml) und T-30 Plastikkulturflaschen (Falcon-Plastic) verwendet. Deckgläschen für die Leighton-tubes wurden mit 95%igem Äthanol entfettet und anschließend in siedendem Aqua bidest. ausgekocht. Danach erfolgte die Trocknung und Hitzesterilisierung.

#### 1.2.5. Primärkulturen

##### 1.2.5.1. Explantatkulturen

Die Regenerationsstückchen wurden einzeln auf entfettete, sterile Deckgläschen aufgepflanzt. Nachdem die Gewebe etwas angetrocknet waren, wurden die Deckgläschen umgedreht und mit einer Pasteurpipette ist an das Gewebe ein Tropfen Kulturmedium gebracht worden. Das Deckgläschen ist dann auf die Kultur-Kammer aufgesetzt worden, nachdem sie zuvor mit 0,8 ml sterilem Aqua dest. angefüllt wurde.

Gewebestückchen in Suspension wurden zu je 2 ml in 7-30 Kulturflaschen pipettiert und gleichmäßig auf der Plastikunterlage verteilt.

#### 1.2.5.2. Zellkulturen

Die Zellsuspensionen wurden auf eine Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellzählung erfolgte nach Anfärbung der Zellen mit einer Lösung von PBS mit 0,1% Trypanblau in einer NEUBAUER Zählkammer. Anließend wurden die eingestellten Zellsuspensionen in die Kulturgefäße pipettiert.

#### 1.2.5.3. Subkultivierung von Primärkulturen

Subkulturen wurden entweder mit Hilfe einer Lösung aus 0,25%igen Trypsin in PBS oder mit einer PBS-Trypsin-Lösung, die 0,025% EDTA enthielt. Diese Lösung enthielt keine  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und die Konzentration des Trypsins war auf 0,06% verringert.

#### 1.2.6. Bebrütungstemperatur

Als Bebrütungstemperatur diente bei allen Kulturen  $+28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2.7. Optische Ausrüstung

Kulturen und Zellen wurden mit einem Leiz-Laborlux-Mikroskop beobachtet. Fotografien von Präparaten sind mit einem Leiz-Ortholux-Phtomikroskop angefertigt worden.

#### 1.2.8. Histologische Präparate

##### 1.2.8.1. Nativpräparate

Die in Leighton-tubes auf Deckgläschen gezüchteten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen sind mit der abgetrockneten Rückseite nach oben auf Objektträger gelegt worden und die Zellen wurden mit einem 14-DIN-Schwarzweiß-Film sofort fotografiert.

##### 1.2.8.2. Färbepräparate

Die Anfertigung von Färbepräparaten erfolgte mit Hilfe des

Deckgläschen wurden zunächst in PBS gewaschen und dann 30 Minuten in Boin's Lösung fixiert. Nach je zweimaligem Spülen in erst 95%igem, dann 75%igem Äthanol und schließlich Aqua dest. erfolgte die Zellkernfärbung für 8 Minuten in DELAFIELD's Hämatoxylin. Die Präparate wurden dann 30 Minuten lang mit Leitungswasser gewässert und anschließend zur Anfärbung des Zellplasmas 15 Minuten lang mit 0,35%iger Eosinlösung behandelt. Es folgte ein kurzes Spülen in Aqua dest. mit anschließendem je zweimaligen Entwässern in 75%igem und 95%igem Äthanol sowie in Xylol (einmal). Die gefärbten Deckgläschen wurden dann auf Objektträger gebracht und in Kanadabalsam eingebettet.

Für die Fixierung von Chromosomen während der Mitose wurde vor der HE-Färbung Vinblastin in einer Konzentration von 0,03 - 0,04  $\mu\text{g/ml}$  Medium verwendet (PFEIFFER und TOLMACH, 1967).

### 1.3. Infektion von Primärzellkulturen und Insektenzell-Linien mit animalen Viren

#### 1.3.1. Virusmaterial

Für die Infizierung der Primärkulturen wurden Tollwutvirus, Stamm ERA, das Virus der lymphocytären Choriomeningitis (LCM), das Sindbis-Virus (SIN) und das Western Equine Encephalitis-Virus (WEE) verwendet.

Tollwutvirus Stamm ERA. Das Ausgangsmaterial wurde in BHK-21-Zellen vermehrt. Als Kulturmedium diente EAGLE's (1959)-Minimal Essential Medium, MEM + 10% Tryptosephosphat-Bouillon + 10% hitzeinaktiviertes Kälberserum. Die Zellkulturen wurden mit Virusmaterial (Titer von  $10^{5,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ ) mit Hilfe der Adsorptionsmethode infiziert und bei  $+28^{\circ}\text{C}$  und  $+33^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 3 Tagen war etwa 70% des Zellrasens zerstört und die Kultur wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen ist das virushaltige Medium als Ausgangsmaterial für die Infizierung von Insektenkulturen verwendet worden. Titrationen in BHK-21-Zellen ergaben einen Titer von  $10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ .

Das Virus der lymphocytären Choriomeningitis, Stamm W/20. Das im Institut verwendete Virus wurde nach intracerebraler Infektion von 3 Wochen alten Mäusen (Weibchen, Stamm NMRI) als 10%ige Suspension in Virusmedium VM2 (SCHWÖBEL und TRAUB, 1959) reisoliert. Die Suspension wurde in Röhrchen abgefüllt und bis zum Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### Sindbis-Virus, Western Equine Encephalitis-Virus.

Beide Virusstämme wurden im Institut verwendet. Zur Herstellung von Virusmaterial wurden die Viren bei  $+37^{\circ}\text{C}$  in primären embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE) vermehrt. Nach jeweils 30 Stunden waren die Kulturen zu 100% zerstört und die virushaltige Kulturflüssigkeit wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren. Der Titer ließ sich für Sindbis-Virus mit  $10^{6,0}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  und für WEE-Virus mit  $10^{6,5}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  bestimmen.

### 1.3.2. Zellkulturen

#### 1.3.2.1. Primärzellkulturen

Für die Infizierung wurden Zellen aus trypsinierten L. m a d e r a e Regenerationsgewebe mit M-Lm-Medium in Zellkulturröhrchen mit 1,5 ml Zellsuspension und Leighton-tubes mit 0,3 ml und 1,5 ml Zellsuspension (BELLCO Nr. 1928 bzw. Nr. 1951) angezüchtet. Nach 3-4 Tagen waren bei  $+28^{\circ}\text{C}$  dichte Einschichtzellkulturen gewachsen.

#### 1.3.2.2. Zell-Linien

Für die Virusstudien wurden SINGH's (1967) Moskito-Zell-Linien *A e d e s a e g y p t i* und *A e d e s a l b o p i c t u s* herangezogen<sup>5)</sup> Die Zellen sind in Zellkulturröhrchen und Leighton-tubes (je 1,5 ml) mit M-M

-----  
5) Die Zell-Linien sind liebenswürdigerweise von Dr. I. SCHNEIDER (Department of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington) zur Verfügung gestellt worden.

Medium (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964) kultiviert worden, jedoch wurde der Anteil an fötalem Kälberserum von 20% auf 5% verringert. Zur Verwendung kam das Serum nach 30 Minuten langer Inaktivierung bei  $+56^{\circ}\text{C}$ . Die Subkultivierung erfolgte durch Abschütteln der Zellen von der Glasunterlage. Bei einer Teilungsrate von 1 : 20 - 1 : 50 waren nach 3 - 4 Tagen dichte Einschichtzellkulturen gewachsen ( $+28^{\circ}\text{C}$ ).

### 1.3.3. Infizierung der Kulturen

#### 1.3.3.1. ERA-Virus

Primärzellkulturen aus Regenerationsgewebe und Zell-Linien sind in Leighton-tubes auf Deckgläschen und Zellkulturröhrchen gezüchtet worden. Das Virusmedium wurde mit M-Lm- bzw. M-M-Medium auf 1 : 7,5 verdünnt und die damit infizierten Kulturen sind nach Absorption des Virus bei Zimmertemperatur für 30 Minuten bei  $+28^{\circ}\text{C}$  und  $+33^{\circ}\text{C}$  mit neuem Kulturmedium 4 Tage lang inkubiert worden.

Der Virusnachweis erfolgte mit Hilfe der Immunofluoreszenz-methode.

Nach der Inkubation der Kulturen wurden die virushaltigen Zellen auf den Deckgläschen mit PBS gewaschen und anschließend mit Aceton (pro Analysis) 30 Minuten lang bei  $+4^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nach der Trocknung der Präparate für 10 Minuten an der Luft schlossen sich die Färbung der fixierten Zellen durch Überschichtung mit spezifischem Konjugat und Inkubation für 40 Minuten bei  $+37^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer an.

Anschließend sind die Präparate mit gepuffertem Glycerin auf Objektträger eingebettet worden.<sup>6)</sup>

---

6) Für die freundliche Überlassung des Konjugates bin ich Herrn Dr. M. FÖRSTER, Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Frankfurt/Main, zu Dank verpflichtet.

Als Negativ-Kontrolle dienten auf gleiche Weise angefertigte, nicht infizierte Kulturen. Als Positiv-Kontrollen wurden Präparate von infizierten BHK--21-Kulturen angefertigt.

Die Untersuchung der Präparate wurde mit einem Leitz Ortholux Photomikroskop (Lichtquelle: Quecksilberhöchst-drucklampe HBO 200, Erreger-Filter KP 500 und BG 38, Sperrfilter K 510) vorgenommen.

#### 1.3.3.2. LCM-Virus

Für die Infizierung mit LCM-Virus sind Schaben-Primärkulturen in Leighton-tubes (0,3 ml) gezüchtet worden. Das Virus wurde 1:20 in M-Lm verdünnt. Die Kulturen sind mit diesem Virusmedium infiziert (je 0,3 ml) und bei +28°C für 3, 4, 5, 7, 9 und 11 Tage inkubiert worden. Der Virusnachweis wurde an Mäusen (3 Wochen alte Weibchen, Stamm NMRI) durch intracerebrale Infektion vorgenommen.

#### 1.3.3.3. Sindbis-Virus, Western Equine Encephalitis-Virus

Für die Infizierung wurden L. m a d e r a e - Primärkulturen in Zellkulturröhrchen (1,5 ml) und Leighton-tubes (0,3 ml) gezüchtet. Beide Virusarten wurden jeweils 2 Stunden bei Zimmertemperatur an die Zellen adsorbiert. Anschließend folgte zweimaliges Waschen der Kulturen mit PBS und Zugabe von frischem Medium. Die Inkubationszeit betrug bei +28°C maximal 4 Tage. Die Titrationsen erfolgten in Zellkulturröhrchen mit primären embryonalen Hühnerfibroblasten.

Als Kontrollversuche wurden Zellkulturröhrchen mit embryonalen Hühnerfibroblasten auf die gleiche Weise infiziert und bei +28°C bebrütet.

## 2. Versuche und Ergebnisse

### 2.1. Entwicklung eines Kulturmediums aus Analysen von Hämolymphe

#### 2.1.1. Analysen von Kationen und Anionen

Die Kationen der Hämolymphe von *L. m a d e r a e* ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) sind dreimal bestimmt worden, den Berechnungen wurden die Durchschnittswerte zugrunde gelegt. Die Bestimmung der Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) ist einmal durchgeführt worden.

Die höchste Konzentration wies bei den Kationen Natrium mit 76 mM/l auf, während die molare Konzentration von Kalium mit 8,8 mM/l nur wenig höher lag als bei Calcium (5,1 mM/l) und Magnesium (4,7 mM/l). Damit ergab sich für das Verhältnis der molaren Konzentrationen der Alkalimetalle ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ein Wert von 8,65.

Entsprechend zu der hohen Natriumkonzentration wurde für Chloridionen ein Wert von 65 mM/l gemessen; während Phosphationen mit 1,4 mM/l den geringsten Wert aufwiesen (Tabelle 6).

|                    | Konzentration<br>in mM/l |
|--------------------|--------------------------|
| $\text{Na}^+$      | 76,0                     |
| $\text{K}^+$       | 8,8                      |
| $\text{Ca}^{2+}$   | 5,1                      |
| $\text{Mg}^{2+}$   | 4,7                      |
| $\text{Cl}^-$      | 65,0                     |
| $\text{PO}_4^{3-}$ | 1,4                      |

Tabelle 6

Analysenwerte von Kationen  
und Anionen der Hämolymphe  
von *L. m a d e r a e*

### 2.1.2. Analysen von Zucker

Nach der gaschromatischen Untersuchung enthielt die Hämolymphe von *L. m a d e r a e* die Zucker Trehalose, Glucose und Saccharose.

Überwiegend kam Trehalose mit einer Konzentration von 7270 mg/l vor. Glucose ist mit 1410 mg/l und Saccharose mit 20 mg/l bestimmt worden (Tabelle 7):

|            | Konzentration<br>in mg/l |
|------------|--------------------------|
| Trehalose  | 7270                     |
| Glucose    | 1410                     |
| Saccharose | 20                       |

Tabelle 7

Analysenwerte der gefundenen Zucker in der Hämolymphe von *L. m a d e r a e*

### 2.1.3. Analysen von Aminosäuren

In der Hämolymphe von *L. m a d e r a e* sind folgende Konzentrationswerte von freien Aminosäuren gefunden worden:

|                  | Konzentration<br>in mM/l |                | Konzentration<br>in mM/l |
|------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| L-Alanin         | 1,60                     | L-Lysin        | 1,80                     |
| L-Arginin        | 0,72                     | L-Methionin    | 0,52                     |
| L-Asparaginsäure | 3,96                     | L-Phenylalanin | 0,72                     |
| L-Cystin         | 0,20                     | L-Prolin       | 3,20                     |
| L-Glutamin       | 2,68                     | L-Serin        | 1,40                     |
| L-Glutaminsäure  | 4,16                     | L-Taurin       | 1,32                     |
| Glycin           | 5,48                     | L-Threonin     | 1,76                     |
| L-Histidin       | 1,80                     | L-Tyrosin      | 2,16                     |
| L-Isoleucin      | 0,60                     | L-Valin        | 2,00                     |
| L-Leucin         | 1,20                     |                |                          |

Tabelle 8

Analysenwerte der freien Aminosäuren in der Hämolymphe von *L. m a d e r a e*

Bemerkenswert ist die relativ hohe Konzentration der Aminosäuren Glycin mit 5,48 mM/l, Glutaminsäure mit 4,16 mM/l, Asparaginsäure mit 3,96 mM/l und Prolin mit 3,2 mM/l gegenüber den übrigen, deren Konzentrationswerte zwischen 0,2 (Cystein) und 2,68 (Glutamin) liegen. In den von LANDUREAU (1966) für *Blattaria* zusammengestellten Kulturmedium (La) liegen die entsprechenden Werte bis auf Asparaginsäure mit 1,5 mM/l höher: Glycin 20 mM/l, Glutaminsäure 6,8 mM/l und Prolin 6,5 mM/l. Arginin weist im La-Medium mit 11,5 mM/l gegenüber 0,72 mM/l der Hämolymphe einen sehr viel höheren Wert auf.

Bei der Analyse der Hämolymphe trat zusätzlich die Aminosäure Taurin (1,32 mM/l) auf, die im La-Medium nicht enthalten ist. Ein Diagramm aller Aminosäuren zeigt Abb. 1.

#### 2.1.4. Zusammenstellung des Kulturmediums M-Lm

Die Konzentrationsberechnung der anorganischen Salze wurde unter Berücksichtigung der Zugabe von NaOH (Einstellung des pH-Wertes), von Phosphationen  $\text{PO}_4^{3-}$  (14,7 mM/l) und von  $\text{NaHCO}_3$  zur Vervollständigung des Mediums durchgeführt.

Für die Herstellung des Kulturmediums M-Lm sind die Bestandteile nachfolgender Aufstellung zu entnehmen:

| <u>Lösung A</u>                                    | mg/l |
|----------------------------------------------------|------|
| NaCl                                               | 2700 |
| KCl                                                | 650  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$          | 750  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          | 950  |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$                           | 1400 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 200  |

| <u>Lösung B</u>  |     |
|------------------|-----|
| $\text{NaHCO}_3$ | 350 |

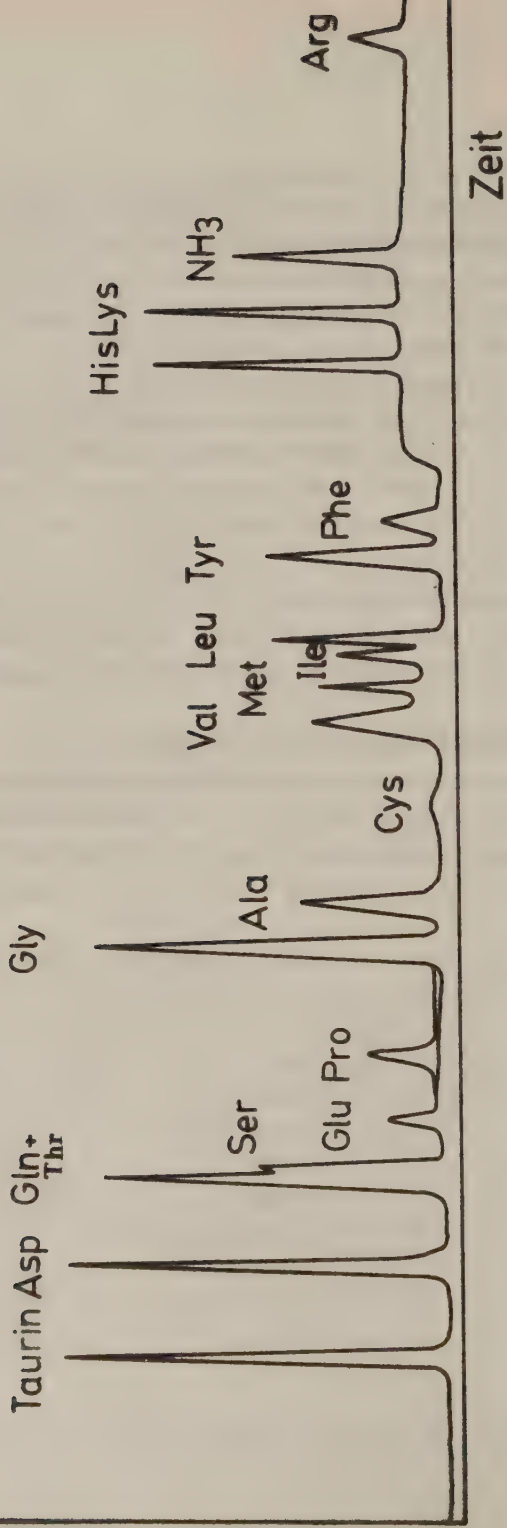


Abb. 1 Diagramm der freien Aminosäuren in Hämolymphe von Larven von Leucophaea maderae

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| <u>Lösung C</u>               | mg/l |
| Glucose                       | 1400 |
| Trehalose · 2H <sub>2</sub> O | 8000 |

Lösung D (L-Aminosäuren)

|                  |     |
|------------------|-----|
| $\alpha$ -Alanin | 145 |
| $\beta$ -Alanin  | 145 |
| Arginin          | 125 |
| Asparaginsäure   | 530 |
| Cystein · HCl    | 30  |
| Glutamin         | 390 |
| Glutaminsäure    | 560 |
| Glycin           | 410 |
| Histidin         | 280 |
| Isoleucin        | 80  |
| Leucin           | 160 |
| Lysin · HCl      | 330 |
| Methionin        | 80  |
| Phenylalanin     | 120 |
| Prolin           | 370 |
| Serin            | 150 |
| Taurin           | 170 |
| Threonin         | 210 |
| Tyrosin          | 390 |
| Valin            | 330 |

Lösung E

Vitamine von GRACE (1962)

Antibiotika

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Penicillin                | 100000 IE |
| Dihydrostreptomycinsulfat | 100 mg    |

Fötale Kälberserum 100 ml

Bezüglich der Aminosäuren wurde der Gehalt an L-Alanin (1,6 mM/l) durch  $\alpha$ -Alanin und  $\beta$ -Alanin mit je 1,6 mM/l ersetzt. Saccharose blieb wegen des niedrigen Analysenwertes unberücksichtigt.

Bei der Herstellung des Mediums wurden zunächst die Aminosäuren bis auf Tyrosin in 500 ml Aqua bidest. gelöst. Tyrosin war zuvor in einer kleinen Menge 1n HCl separat gelöst und dann den übrigen Aminosäuren zugefügt worden (Lösung D). Die Bestandteile von Lösung A wurden dann in 200 ml Aqua bidest. gelöst und zu Lösung D gegeben. Es folgte die Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 6,8. Nach Zugabe der Zucker (gelöst in 100 ml Aqua bidest., Lösung C) und der Vitamine ( $10^3$ -fach in Aqua bidest. gelöst, Lösung E) ist mit Aqua bidest. das Endvolumen von 900 ml eingestellt worden. Die Sterilisierung des Mediums erfolgte durch Filtration (EKS - 1 Filterschicht).

Kurz vor Gebrauch des Mediums wurden hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum und die Antibiotika zugegeben. Die Einstellung des pH-Endwertes auf 7,2 erfolgte durch Zugabe von 5 ml einer 7%igen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (Lösung B), die zuvor durch Autoklavieren sterilisiert worden war.

Dem Medium wurden in Vorversuchen außerdem eine Reihe anderer biologischer Zusätze wie Lactalbuminhydrolysat (0,65%), Yeast Extrakt (0,5%), Rinderserumalbumin (1%) und Hühnereiultrafiltrat (5 - 10%) sowie *Leucophaea maderae* - Hämolymphe in Konzentrationen von 1 - 5% zugefügt, um ein besseres Zellwachstum aus Geweben von *L. maderae* erzielen zu können.

## 2.2. Gewebekulturen

### 2.2.1. Explantatkulturen

In Tabelle 9 sind alle Nährmedien aufgeführt, die auf ihre Eignung für das Wachstum von Zellen aus explantierten Regeneratstückchen von *L. maderae* getestet wurden. 24 Stunden nach Inkubation im "Hängenden Tropfen" sind (bei  $+28^\circ\text{C}$ ) die Kulturen erstmals auf Zellwachstum kontrolliert worden. Das Medium wurde dann täglich erneuert. Allen Medien war 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt.

| Medium                                 | Zellauswachsen nach | Mediumwechsel               | Überleben der Zellen |
|----------------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------|
| M-M (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964) | -                   | -                           | -                    |
| La (LANDUREAU, 1966)                   | 24 h                | keine Änderung              | 2 - 3 Wochen         |
| M-18 (GIBCO)                           | 24 h                | Zellen degeneriert          | -                    |
| GMA (GRACE, 1962)                      | -                   | -                           | -                    |
| M-Lm                                   | 24 h                | Zellwachstum<br>2 Zelltypen | 2 - 3 Wochen         |

Tabelle 9 Überleben von Explantatkulturen aus Regenerationsgeweben von *L. m a d e r a e* mit verschiedenen Kulturmedien.

Am besten geeignet für das Zellwachstum aus den Explantaten waren die Medien M-Lm und La. Bei den Kulturen mit M-Lm-Medium konnten 2 Zelltypen nachgewiesen werden: neben fibroblastenartigen Zellen konnten kleine runde Zellen beobachtet werden (Abb. 2 und 3).

Da bei den Kulturen mit La-, M-18- und M-Lm-Medium schon nach 24 Stunden Zellwachstum beobachtet werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den fibroblastenartigen Zellen um mitexplantierte Hämocyten handelt.

Obwohl auch bei Verwendung von M-18-Medium Zellwachstum auftrat, degenerierten die Zellen bald nach dem Mediumwechsel. Bei den Explantatkulturen mit den Medien M-M und GMA kam es nicht zum Auswachsen von Zellen.



Abb.2 Explantatkulturen von Regenerationsgewebe von *L. maderae* im "Hängenden Tropfen" nach 48 Stunden Bebrütungsdauer. (Kulturmedium M-Lm).  
f fibroblastenartiger Zelltyp, r runde Zellen.  
Nativpräparat x 63

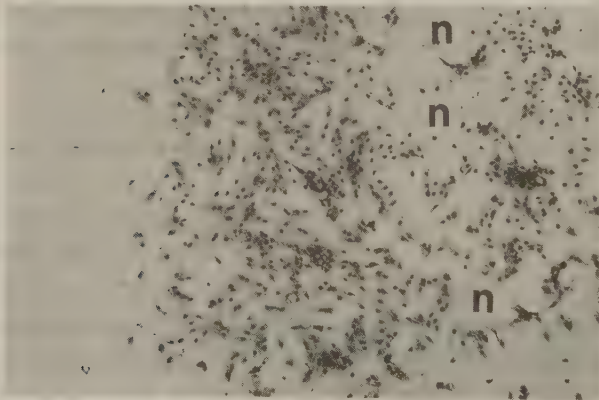


Abb.3 3 Tage alte Explantatkultur von Regenerationsgewebe von *L. maderae* in einer T-30-Kulturflasche (Medium M-Lm). Explantat abgelöst; u ursprüngliche Anhaftungsstelle des Explantates mit eingewanderten Zellen.  
HE-Färbung x 63

*Leucophaea maderae* - Explantatstückchen ließen sich auch gut in T-30-Kulturgefäßen (Abb. 3) kultivieren. Die an den Kulturen im "Hängenden Tropfen" gewonnenen Erfahrungen erbrachten im Hinblick auf die Ergebnisse mit den Kulturmedien eine Bestätigung.

Die Gewinnung von Primärzellen aus Explantatstückchen von Regenerationsgewebe, kultiviert in T-30-Kulturflaschen ist reproduzierbar. Für die Kultivierung wird pro T-30-Kulturflasche das Regenerationsgewebe von 2 Coxen benötigt.

#### 2.2.2. Zellkulturen aus embryonalem Gewebe

Bei der Trypsinierung mit 0,25%igem Trypsin in PBS bei +37°C wurden gute Zellausbeuten erzielt. Voraussetzung für eine optimale Zellausbeute war jedoch die Verwendung von auf +37°C vorgewärmter Trypsinlösung und eine Aufschlußzeit von 2x20 Minuten.. Eine längere Trypsinierungszeit erwies sich als unvorteilhaft, da die Gewebe und Zellen vom Trypsin danach zerstört wurden.

Von 4 - 6 Kokons ließen sich durchschnittlich 3,2 g Embryonen gewinnen. Nach der Trypsinierung betrug die Gesamtzahl etwa  $7,3 \cdot 10^6$ , so daß sich damit eine durchschnittliche Zellausbeute von  $2,28 \cdot 10^6$  Zellen pro Gramm embryonalen Gewebes ergab (Tabelle 10).

Für die Kultivierung der Zellen wurden die Medien M-Lm und La verwendet. Sie gestatteten als einzige das Überleben und Wachstum von Zellen. Die Zellen wurden in Zellkultur-röhrchen und T-30-Kulturflaschen eingesät. Nach 6 Stunden setzten sich die Zellen bereits an der Glasunterlage fest und nach 12 Stunden trat ein Zusammenlagern der Zellen zu Aggregaten auf. Nach weiteren 3 Tagen waren von den Aggregaten Zellen ausgewachsen.

Während die Zellen der Kulturen mit M-Lm-Medium in den darauffolgenden 2 Tagen zu dichten Einschichtkulturen

auswuchsen (Abb. 4), war bei den Kulturen mit La-Medium nur ein begrenztes Wachstum in der Nähe der Aggregate festzustellen. Zur Bildung von Einschichtzellkulturen mit M-Lm-Medium waren Einsaatmengen von mindestens  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml notwendig. Höhere Zelleinsaatkonzentrationen als  $8 \cdot 10^5$  Zellen/ml hatten keinen Einfluß auf das Zellwachstum, da nur die Aggregatbildung gefördert wurde.

Mediumwechsel wurde im Durchschnitt alle 2-3 Tage vorgenommen. Die Kulturen konnten so bis zu 12 Wochen am Leben erhalten werden.

In Zellkulturen aus embryonalem Gewebe von *L. m a d e r a e* ließen sich Zellen polygonaler und fibroblastenartiger Morphologie unterscheiden (Abb. 4). Polygonale Zellen, die mit 60-70% den Hauptanteil der Kulturen bildeten, waren mit einem Durchmesser von 40-64  $\mu$  relativ groß gegenüber den fibroblastenartigen mit einer Länge von 48-56  $\mu$  und einer Breite von 12-16  $\mu$ . In einigen Fällen konnten Zellen mit einem Durchmesser von bis zu 95  $\mu$  nachgewiesen werden.

| Versuch Nr. | Anzahl der Eikokons | Gewicht der Embryonen (g) | Zellausbeute (Zellzahl/Gramm Gewebe) |
|-------------|---------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1           | 5                   | 3,25                      | $1,46 \cdot 10^6$                    |
| 2           | 4                   | 3,20                      | $1,65 \cdot 10^6$                    |
| 3           | 6                   | 3,65                      | $3,30 \cdot 10^6$                    |
| 4           | 5                   | 3,10                      | $2,90 \cdot 10^6$                    |
| 5           | 6                   | 3,85                      | $2,75 \cdot 10^6$                    |
| 6           | 4                   | 2,20                      | $1,60 \cdot 10^6$                    |
| $\phi$      | 5                   | 3,20                      | $2,28 \cdot 10^6$                    |

Tabelle 10: Ergebnis der Zellausbeuten von embryonalem Gewebe von *L. m a d e r a e* nach Trypsininierung von 2 x 20 Minuten.

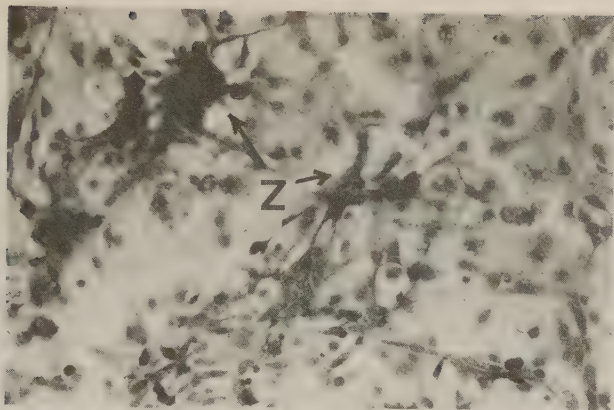


Abb.4 Zellkultur von embryonalem Gewebe von L. m a d e r a e (Medium M-Lm) 3 Tage nach Einsaat.  
Z Zellaggregate HE-Färbung x 125

### 2.2.3. Zellkulturen aus Regenerationsgeweben

Für das Aufschließen der Regenerationsgewebe ist am erfolgreichsten eine 0,25%ige Trypsinlösung verwendet worden, die bei  $+37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt worden war. Längeres Trypsinieren brachte auch hier keine höheren Zellausbeuten. Von 90 Coxen (30 Larven 3-fach amputiert) konnten durchschnittlich 2,0 g Gewebe gewonnen werden. Nach dem Trypsinieren betrug die Gesamtzahl der Zellen im Durchschnitt  $5,6 \cdot 10^6$ . Damit ergab sich eine durchschnittliche Zellausbeute von  $2,8 \cdot 10^6$  Zellen pro Gramm Regenerationsgewebe (Tabelle 1).

Die Zellen wurden in Konzentrationen von  $5 \cdot 10^5$  pro ml Medium in Zellkulturröhrchen, Leighton-tubes und 250-ml Kulturflaschen eingesät. Höhere Einsaatmengen als  $5 \cdot 10^5$  Zellen hatten auch hier nur eine Verstärkung der Aggregatbildung zur Folge. Nach 12 Stunden Inkubationszeit setzten sich die ausgesäten Zellen bereits fest und lagerten sich wie Zellen von embryonalem Gewebe zu Aggregaten zusammen. Nach weiteren 12 Stunden wanderten Zellen aus und vermehrten sich.

Bei der Trypsinierung war Regenerationsgewebe von *Leucophaea maderae* konnten höhere Zellausbeuten erzielt werden als bei der Trypsinierung von embryonalem Gewebe.

#### 2.2.4. Zellkultur aus Hämocyten

Die Hämolymphe ist wie unter Material und Methoden beschrieben direkt in das Kulturmedium getropft und dort sofort suspendiert worden. Für die Kultivierung der Hämocyten genügte die Verwendung von 2 Larven pro 3 ml Kulturmedium.

Bei +28°C setzten sich nach etwa 2 Stunden die Zellen an der Glasunterlage fest und das Medium wurde gewechselt, um Zell-Aggregate zu entfernen. Nach weiteren 48 Stunden waren dichte Einschichtzellkulturen gewachsen.

Im Wesentlichen sind 2 Zelltypen zu unterscheiden: fibroblastenartige Zellen mit einer Breite von etwa 15  $\mu$  und einer Länge von 88  $\mu$  und runde, granulierte Zellen mit einem Durchmesser von 24 - 32  $\mu$  (Abb.9).

Bei den Kulturen wurde alle 2 - 3 Tage das Medium gewechselt, nachdem der Farbindikator umgeschlagen war.

Hämocytenkulturen konnten nicht lange am Leben erhalten werden. sie begannen nach einer Woche mit dem langsamen Degenerieren.

Ihrer Morphologie nach lassen sich die Hämocyten den Plasmacyten zuordnen (MITSUHASHI, 1966).

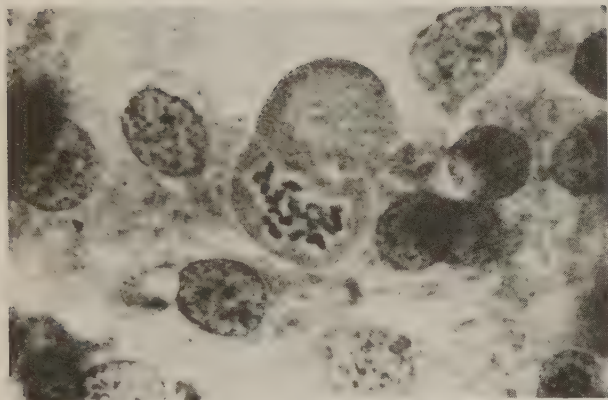


Abb.5 Zellkultur aus Regenerationsgewebe von *L. maderae* (Medium M-Lm) 4 Tage nach Einsaat:  
Metaphasezelle nach Zugabe von Vinblastin  
HE-Färbung x 900

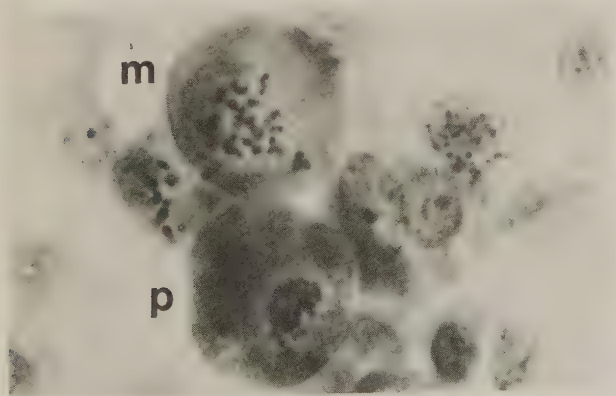


Abb.6 Zellkultur aus Regenerationsgeweben von *L. maderae* (Medium M-Lm) 4 Tage nach Einsaat: p Prophasezelle, m Metaphasezelle nach Zugabe von Vinblastin  
HE-Färbung x 900

Die mitotische Aktivität der Zellen konnte 2 Tage nach deren Einsaat nach Zugabe von 0,03 bis 0,04  $\mu\text{g}$  Vinblastin pro ml Medium nachgewiesen werden (Abb. 5 und 6). In einem Zeitraum von 48 Stunden sind etwa 30 der kultivierten Zellen in der Mitose arretiert worden.

Für die Kultivierung hat sich besonders das Medium M-Lm mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum bewährt. Während bei den Kulturen mit La-Medium ein Auswachsen der Zellen von den Aggregaten erst nach 3 Tagen erfolgte, sind die Zellen der Kulturen mit M-Lm-Medium bereits nach 4 Tagen zu dichten Einschichtzellkulturen ausgewachsen. (Abb. 7). Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Kulturen ließen sich für mehr als 3 Monate am Leben erhalten.

Zellen von Kulturen aus Regenerationsgewebe von *L. m a d e r a e* wiesen eine ähnliche Morphologie auf wie die von embryonalem Gewebe (Abb. 8).

Polygonale Zellen mit einem Durchmesser von 48 - 66  $\mu$  und fibroblastenartige Zellen mit einer Länge von 56 - 72  $\mu$  und einer Breite von 12 - 20  $\mu$  waren etwa gleich häufig in der Kultur verteilt.

| Versuch Nr. | Anzahl der Coxen | Gewicht der Regenerate (g) | Zellausbeute (Zellzahl/ Gramm Gewebe) |
|-------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 1           | 58               | 1,50                       | $1,5 \cdot 10^6$                      |
| 2           | 74               | 1,80                       | $3,0 \cdot 10^6$                      |
| 3           | 60               | 1,80                       | $1,1 \cdot 10^6$                      |
| 4           | 60               | 2,35                       | $4,3 \cdot 10^6$                      |
| 5           | 81               | 1,50                       | $4,2 \cdot 10^6$                      |
| 6           | 117              | 2,95                       | $2,5 \cdot 10^6$                      |
| $\emptyset$ | 90               | 2,00                       | $2,8 \cdot 10^6$                      |

Tabelle 11 Ergebnisse der Zellausbeute von Regenerationsgewebe von *L. m a d e r a e* nach Trypsininierung von 2 x 20 Minuten.

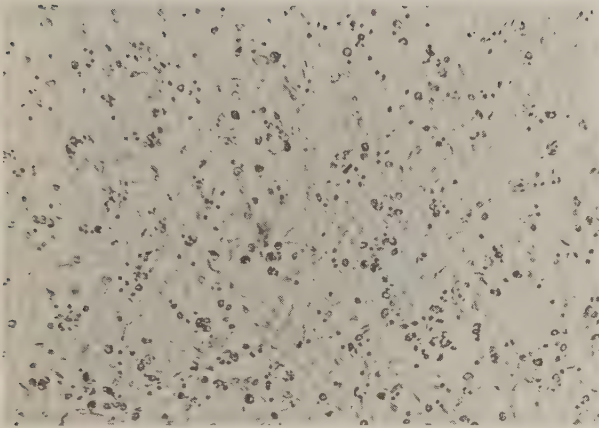


Abb.7 Zellkultur aus Regenerationsgewebe von L. m a -  
d e r a e (Medium M-Lm) 4 Tage nach Einsaat.  
Nativpräparat x 63

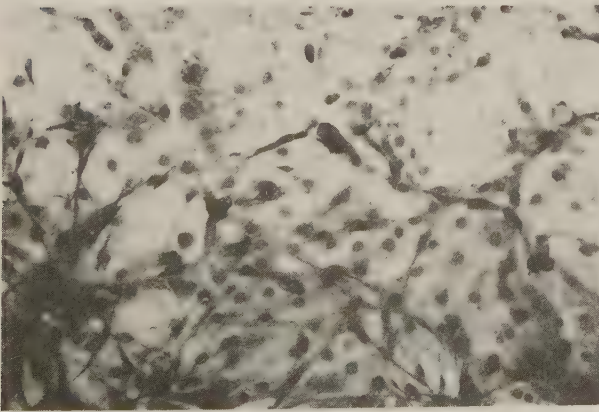


Abb.8 Zellkultur aus Regenerationsgewebe von L. m a -  
d e r a e (Medium M-Lm) 4 Tage nach Einsaat.  
HE-Färbung x 125

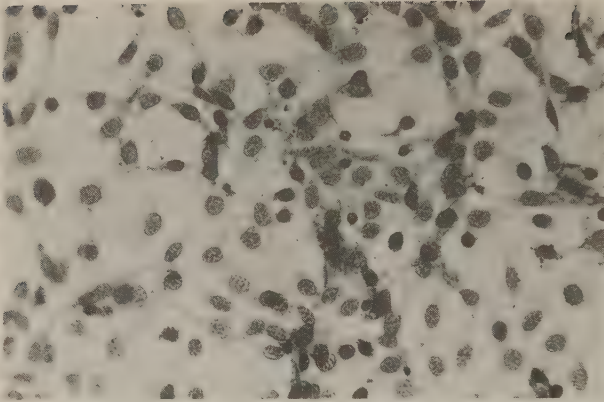


Abb.9 Hämocytenkulturen aus der Hämolymphe von L. m a -  
d e r a e (Medium M-Lm) 3 Tage nach Einseat.

HE-Färbung x 125

#### 2.2.5. Einfluß biologischer Mediumzusätze auf das Zellwachstum

An Zellkulturen aus embryonalen Geweben, Regenerationsgeweben und Hämocyten waren alle Zusätze (Lactalbuminhydrolysat 0,65%, Yeast Extrakt 0,5%, Rinderserumalbumin 1%, Hühnereiultrafiltrat 5 - 10% dem verwendeten fötalen Kälberserum unterlegen. Hitzeinaktivierte Hämolymphe von L. m a d e r a e (+56°C für 30 Minuten) war in einer Konzentration von 1 - 5% der Wirkung von fötalem Kälberserum zwar ähnlich, zeigte aber hinsichtlich der Wachstumsdynamik der Zellen keine besseren Ergebnisse.

#### 2.2.6. Subkultivierung der Primärkulturen

Kulturen aus embryonalen Geweben, Regenerationsgeweben und Hämocyten konnten nicht subkultiviert werden.

Bei Verwendung von PBS-Trypsin-Lösung ließen sich bei +28°C die Zellen und Zellverbände nur schwer von der Glasunterlage

ablösen. Diese Schwierigkeit trat zwar bei Verwendung von EDTA nicht auf, die Zellen wurden aber dabei stark geschädigt.

Ähnliche Erfahrungen wurden bei Versuchen gemacht, die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Einsaat zu subkultivieren. Das beste Ergebnis konnte mit Zellverbänden aus Kulturen von Regenerationsgeweben erzielt werden. Nachdem sie sich an der Unterlage des Kulturgefäßes festgesetzt hatten, wuchsen nach 24 Stunden randständig Zellen aus, die jedoch innerhalb der folgenden Woche degenerierten.

### 2.3. Verhalten animaler Viren in Primärzellkulturen und Insektenzell-Linien

#### 2.3.1. Tollwut-Virus, Stamm ERA

Die Bebrütungszeit der mit Tollwutvirus infizierten *Leucophaea maderae* - Primärkulturen sowie der Zell-Linien in Röhrchen und Leighton-tubes-Kulturen betrug 2, 4 und 6 Tage bei  $+28^{\circ}\text{C}$  und  $+33^{\circ}\text{C}$ . Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, während die Deckgläschen der Leighton-tubes für die Immunofluoreszenz mit Aceton fixiert wurden.

In den Kulturen, die bei  $+28^{\circ}\text{C}$  bebrütet worden sind, vermehrte sich das Tollwutvirus nicht.

Bei Bebrütung bei  $+33^{\circ}\text{C}$  dagegen trat nach 4 Tagen eine begrenzte Vermehrung in einigen Zellen von *L. maderae* auf, die mit Hilfe der Immunofluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Es wurden im Plasma liegende, deutlich abgesetzte, verschieden große, granuläre, homogene, stark fluoreszierende Einschlüsse nachgewiesen, (Abb.10 + 11), die sich von denen, die in infizierten Kontrollkulturen (PHK-21) auftraten, nicht unterschieden. Auffallend war, daß sich das ERA-Virus nur in bestimmten Zellen zu vermehren schienen. Eine Vermehrung trat in erster Linie in Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie auf. In Zellen mit



Abb.10 Plasmafluoreszenz nach Infektion von Primärzellen aus Regenerationsgeweben von *Leucophaea maderae* mit Tollwut-Virus, Stamm ERA 4 Tage p.inf. x 630

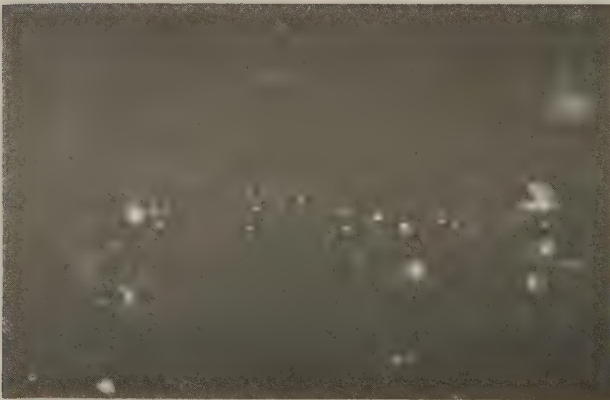


Abb.11 Plasmafluoreszenz nach Infektion von Primärzellen aus Regenerationsgeweben von *Leucophaea maderae* mit Tollwut-Virus, Stamm ERA 4 Tage p.inf. x 630

epithelartigem Aussehen wurde eine Virusvermehrung nicht festgestellt.

Insgesamt waren etwa 5% der Zellen einer Kultur positiv in der Immunofluoreszenz.

Tollwut-Virus, Stamm ERA, vermehrte sich nach 4 Tagen ( $+33^{\circ}\text{C}$ ) darüber hinaus auch in Zellen der Zell-Linien von *Aedes aegypti* (SINGH, 1967) als auch von *Aedes albopictus* (SINGH, 1967), wie mit Hilfe der Immunofluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

Die Fluoreszenz in infizierten Zellen war ähnlich den Strukturen, die schon in *Leucophaea maderae* - Zellkulturen beobachtet wurden und unterschied sich nicht von den Einschlüssen in infizierten BHK-Kontrollkulturen. Die Granula waren lediglich etwas kleiner.

Wie schon bei Tollwut-infizierten *L. maderae* - Zellen festgestellt, trat auch bei der *A. albopictus* Zell-Linie eine Vermehrung des Virus hauptsächlich in fibroblastenähnlichen Zellen auf. In polygonalen Zellen wurde keine Vermehrung des Tollwutvirus nachgewiesen. (Abb.12)

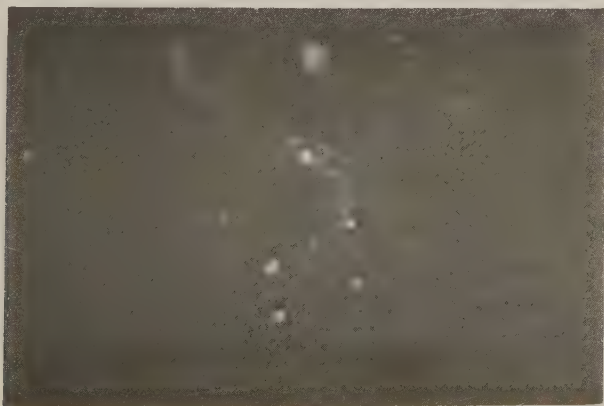


Abb.12 Plasmafluoreszenz nach Infektion von *Aedes albopictus* - Zellen mit Tollwut-Virus, Stamm ERA, 4 Tage p.inf. x 630

Am besten vermehrte sich Tollwutvirus in den Zellen der *Aedes aegypti*-Linie. Die Qualität der Fluoreszenz unterschied sich nicht von der in anderen empfänglichen Zellen. Nur war der Anteil der virusvermehrenden Zellen hier etwas höher als in der *Aedes albopictus*-Zell-Linie (25%), er betrug etwa 33%. (Abb. 13).

Die Virusvermehrung scheint jedoch nur auf eine Passage in den verwendeten Zellsystemen beschränkt zu sein. Je Zellart wurden nach einmaligem Einfrieren und Auftauen der Zellen der ersten Passage zwei weitere Passagen durchgeführt. Untersuchungen mit Hilfe der Immunofluoreszenz verliefen in den Zellen von *Leucophaea maderae* und in den beiden verwendeten Zell-Linien von *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* negativ, im Gegensatz zu den gleichermaßen behandelten empfänglichen BHK-Zellen, in denen sich das Virus deutlich vermehrte (Abb. 12).

| Zellsystem                            | Bebrütungsdauer<br>Tage | % inf.<br>Zellen | Besonderheiten                                       |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| Primärzellen von<br><u>L. maderae</u> | 4                       | 5                | Vermehrung vornehmlich in fibroblastenartigen Zellen |
| <u>A. aegypti</u> -<br>Zell-Linie     | 4                       | 33               | Vermehrung in allen Zelltypen                        |
| <u>A. albopictus</u> -<br>Zell-Linie  | 4                       | 25               | Vermehrung vornehmlich in fibroblastenartigen Zellen |
| BHK-21-Zellen<br>(pos. Kontrolle)     | 2                       | 100              | beginnender cytopathischer Effekt                    |

Tabelle 12 Daten über die Vermehrung des Tollwut-Virus, Stamm ERA, in Insektenzellkulturen und BHK-Kontrollkulturen bei +33°C.

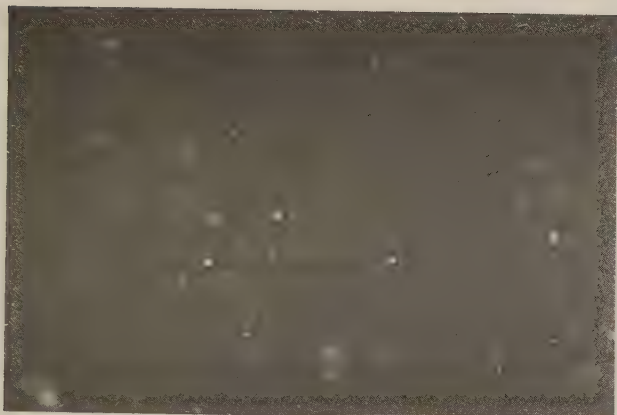


Abb.13 Plasmafluoreszenz nach Infektion von A e d e s  
a e g y p t i - Zellen mit Tollwut-Virus, Stamm ERA,  
4 Tage p.inf. x 630

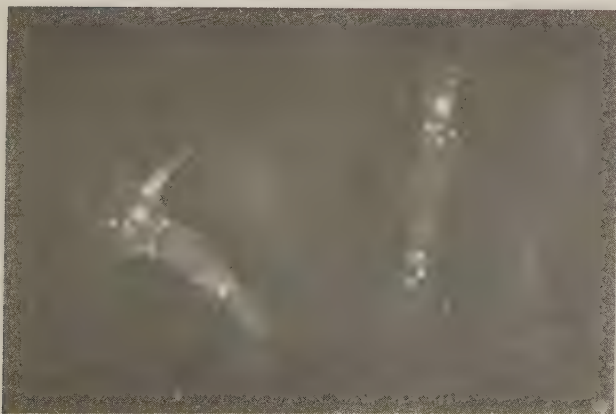


Abb.14 Plasmafluoreszenz nach Infektion von BHK-21-Zellen  
mit Tollwut-Virus, Stamm ERA, 2 Tage p.inf. x 630

### 2.3.2. LCM - Virus

Infizierte *Leucophaea maderae* - Kulturen wurden bei +28°C bebrütet und nach 3, 4, 5, 7, 9 und 11 Tagen bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Virus-Zellsuspensionen 1:3 in VM2 verdünnt und in Mengen von 0,03 - 0,05 ml auf Mäuse verimpft. Pro Probe wurden 4 Mäuse verwendet.

Wie Tabelle 13 zeigt, verliefen alle Virusnachweise auf Mäusen negativ. Keine der mit dem infizierten *L. maderae* - Zellkulturmaterial inoculierten Tiere zeigte klinische Erscheinungen oder eine Mortalität, die für eine LCM-Infektion sprach. Dagegen starben alle mit dem Virusausgangsmaterial infizierten Kontrolltiere 6 Tage p.inf.

| Dauer der Bebrütung +28°C in Tagen | Mäuse inoculiert/Mäuse gest. | Mortalität % |
|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| 3                                  | 4/0                          | 0            |
| 4                                  | 4/0                          | 0            |
| 5                                  | 4/0                          | 0            |
| 7                                  | 4/0                          | 0            |
| 9                                  | 4/0                          | 0            |
| 11                                 | 4/0                          | 0            |
| Virusausgangsmaterial              | 4/4                          | 100          |

Tabelle 13 Ergebnisse der Züchtung von LCM-Virus in *Leucophaea maderae* - Zellen.

### 2.3.3. Sindbis-Virus, Western Equine Encephalitis-Virus

Infizierte, primäre Regenerat-Zellkulturröhrchen von *L e u c o p h a e a m a d e r a* wurden nach Adsorption der Viren (0 Stunden), nach 24 Stunden, 48 Stunden und nach 4 Tagen p.inf. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und alle Proben wurden gleichzeitig titriert.

Die Titer sind der Abb.16 zu entnehmen.

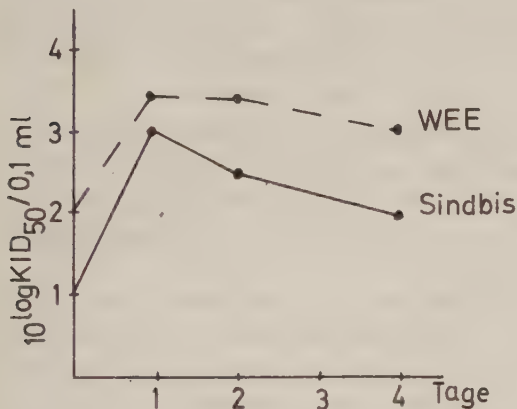


Abb. 16 Vermehrung von Sindbis- und Western Equine Encephalitis Virus in Primärzellkulturen aus Regenerationsgewebe von *L. m a d e r a e* über 96 Std.

Zur Erstellung einer Einschnitt-Vermehrungskurve wurde der Zeitraum von der Infektion bis zum Auftreten des höchsten Virustiters (24 Stunden p.inf.) gesondert untersucht. Die Virus-Infektionsdosis betrug dabei 2 infektiöse Einheiten pro Zelle. Proben wurden alle 4 Stunden entnommen.

Wie Abb. 16 zeigt, vermehrten sich beide Viren um das etwa 20 - 100fache. Sindbis-Virus scheint sich bei einer Titerzunahme von  $10^2$  besser zu vermehren als Western Equine Encephalitis-Virus, das nur eine Titerzunahme von  $10^{1,3}$  zeigte. Nach Erreichen des Höchsttiters tritt ein langsamer Titerrückgang auf.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Einschnittvermehrungskurve, wobei die Unterschiede zwischen Sindbis- und Western Equine Encephalitis-Virus noch deutlicher auftraten. Der Höchstititer bei Sindbis-Virus ist etwa 16 Stunden p.inf. erreicht, bei Western Equine Encephalitis-Virus nach etwa 20 Stunden (Abb. 16).

Beide Viren ließen sich in primären *L. maderae* - Regenerat-Zellen in Passagen fortführen. Nach Inkubationszeiten von 24 Stunden p.inf. wurden bei den Virusarten bei +28°C Infektionstiter von  $10^{3,5} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$  gemessen. Beide Viren wurden zweimal passiert.

Als Kontrollkulturen dienten primäre embryonale Hühnerfibroblastenzellen. Die Titer bei +28°C 24 Stunden p.inf. konnten im Falle von Sindbis-Virus mit  $10^{5,5} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$  und für Western Equine Encephalitis-Virus mit  $10^{6,0} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$  bestimmt werden.

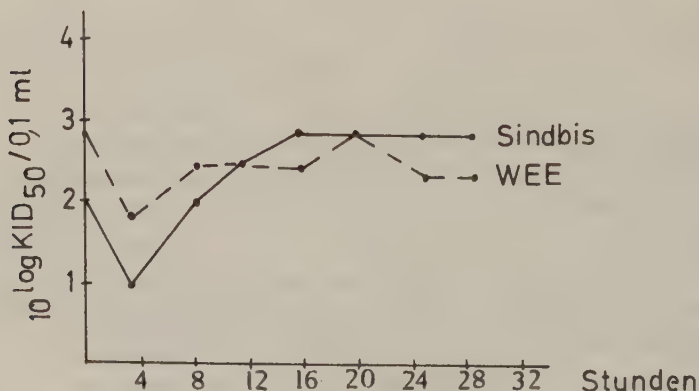


Abb. 16 Einschnittvermehrungskurve von Sindbis- und Western Equine Encephalitis-Virus (input 2 infektiöse Einheiten pro Zelle) in primären *L. maderae* - Regeneratzellen.

## D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Über die Züchtung von Arthropodengeweben und -zellen in vitro liegen systematische Untersuchungen bisher nicht vor. Eines der Hauptprobleme bei der Kultivierung ist die Herstellung eines geeigneten Nährmediums; als Kriterium für deren Zusammenstellung kann offenbar nur die Hämolymphe der Tiere herangezogen werden. Da bei Arthropoden, im Gegensatz zum Serum bei Säugetieren, große Unterschiede in der Zusammensetzung der Hämolymphe auftreten, nicht nur zwischen verschiedenen Spezies sondern auch innerhalb verschiedener Entwicklungsstadien derselben Spezies (FLORKIN und JEAUNIAUX, 1964), ist die Entwicklung eines generellen Nährmediums von vornherein ausgeschlossen.

Die molaren Konzentrationen der Kationen bei Hämolymphe von verschiedenen Spezies schwanken beträchtlich: das Na/K-Verhältnis liegt zwischen 0,1 und 25. Ebenso lassen sich bei den verwendeten Kulturmedien analoge Extremwerte angeben: 0,2 bei GRACE's Insektenkulturmedium und 13,5 bei LANDUREAU's (1966; 1968) Medium.

Wegen ihrer geringen Größe kann jedoch von einer Reihe von Insekten nicht genügend Hämolymphe für Analysen gewonnen werden, so daß auf bereits vorhandene Insektenkulturmedien zurückgegriffen werden muß. Da noch sehr wenige Informationen über die Zusammensetzung verschiedener Hämolympphen vorliegen, ist die Kultivierung von Primärzellen mit bereits beschriebenen Medien dem Zufall überlassen.

In den eigenen Untersuchungen wurde für die Kultivierung von Primärzellen der Schabe *Leucophaea maderae* ein spezielles Medium entwickelt (M-Lm).

Als Grundlage diente von Larven gewonnene Hämolymphe.

Das Na/K-Verhältnis in diesem Medium liegt mit 8,65 etwa zwischen dem von MARKS' für *L. m a d e r a e* entwickelten M-18-Medium (GIBCO) mit einem Verhältnis von 5,7 und dem von LANDUREAU (1966, 1968) für verschiedene *B l a t t a r i a* - Spezies entwickeltes Medium (La) mit 13,5. In seinem Kationengehalt kommt das M-Lm-Medium dem von LANDUREAU entwickelten Medium am nächsten. Vergleicht man die molaren Konzentrationen der Kationen von M-Lm und La-Medien miteinander, so findet man bis auf den schon angegebenen etwa doppelt so hohen Na-Wert beim La-Medium ähnliche Verhältnisse. Die Werte für M-Lm - La sind für  $\text{Na}^+$  76,0 - 162,0;  $\text{K}^+$  8,8 - 12,0;  $\text{Mg}^{2+}$  4,7 - 5,6 und  $\text{Ca}^{2+}$  5,1 - 5,6.

Dagegen bestehen größere Unterschiede zwischen dem in diesen Untersuchungen auf der Basis von Hämolymphe entwickelten M-Lm-Medium und dem M-18-Medium (GIBCO). Im direkten Vergleich findet man, daß alle Werte des M-Lm-Mediums etwa doppelt so hoch liegen, wie die des M-18-Mediums. Die Werte für M-Lm - M-18 sind für  $\text{Na}^+$  76,0 - 30,1;  $\text{K}^+$  8,8 - 5,3;  $\text{Mg}^{2+}$  4,7 - 2,0 und  $\text{Ca}^{2+}$  5,1 - 3,0.

Aus einem Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Medien läßt sich entnehmen, daß die Konzentration der einzelnen Aminosäuren im wesentlichen vergleichbare Werte aufweist. Gegenüber dem M-Lm-Medium ist dem La-Medium etwa 10mal mehr Arginin bzw. 4mal mehr Glycin zugesetzt, während die übrigen Aminosäuren Konzentrationsunterschiede von bis zu 100% zugunsten beider Medien aufweisen. Im M-18-Medium tritt ein starker Unterschied nur bei Arginin mit einer etwa 9-fachen Konzentration gegenüber der im M-Lm-Medium auf.

In GRACE's (1962) Insektenkulturmedium (GMA) ist dagegen die etwa 10fach höhere Konzentration von Histidin gegenüber dem M-Lm-Medium enthalten. Alle übrigen Aminosäuren entsprechen bezüglich der Konzentration einander.

Qualitative Unterschiede sind durch das alleinige Auftreten von Taurin im M-Lm-Medium zu finden. Außerdem ist im Unterschied zum M-18- und GMA-Medium Asparagin nicht in den Medien M-Lm und La enthalten.

Der Gehalt an Aminosäuren im M-M-Medium (MITSUHASHI und MARAMOROSCH, 1964) wird durch 0,65%iges Lactalbuminhydrolysat bestimmt.

Bei der Bestimmung von Zuckern in der Hämolymphe von *L. maderae* war Trehalose in einer Konzentration von etwa 7200 mg/l enthalten. Daneben kam noch Glucose und Saccharose in kleinen Konzentrationen vor. Die bevorzugte Verwendung von Trehalose als Energiespender in Insekten ist schon von GRACE (1963) beschrieben worden. Trehalose scheint als Energiespender jedoch nicht essentiell für in-vitro-Verhältnisse zu sein, da sie bei den meisten bisher gezüchteten Arthropodenzellen im Reagenzglas von Saccharose ersetzt werden konnte.

Im Vergleich mit Vertebratenzellkultur-Medien ist der Zuckergehalt in den Insektenkultur-Medien extrem hoch. Während in Vertebratenzellkultur-Medien etwa 1000 mg/l ausreichen, beträgt die Zuckermenge in Insektenkultur-Medien mindestens 8000 - 10000 mg/l.

Der Zuckergehalt des M-Lm-Mediums liegt in der Größenordnung von LANDUREAU's (1966) Medium, unterscheidet sich jedoch vom M-18-Medium, welches insgesamt 33000 mg/l enthält.

Der Gehalt an Vitaminen der verschiedenen Medien scheint kein kritischer Faktor zu sein, da bei den bisher bekannten Medien die von GRACE (1962) beschriebenen mit Erfolg verwendet wurden.

Als weiterer Zusatz wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), das zuvor auf seine Toxizität gegenüber *L. m a d e r a e* - Zellen geprüft worden war, zugefügt. Der Zugabe von 10% FKS war allen anderen in Vorversuchen verwendeten, von der Mammaliazellkultur her bekannten biologischen Zusätzen wie Yeast Extrakt, Lactalbuminhydrolysat, Hühnereiultrafiltrat und sogar Hämolymphe aus *L. m a d e r a e* überlegen. Die Verwendung von hitzeinaktivierter Hämolymphe in Konzentrationen zwischen 1 und 5% war in ihrer Wirkung auf das Zellwachstum dem FKS vergleichbar.

Bei der Kultivierung von Zellen aus *L. m a d e r a e* sind embryonale Gewebe, Regenerationsgewebe und Hämocyten von Larven verwendet worden.

Für ein Gramm Embryonen sind je nach Größe 1 - 2 Kokons notwendig. Daraus lassen sich bei einer Einsaatmenge von  $5 - 8 \times 10^5$  Zellen/ml etwa 5 - 8 ml fertige Zellkultursuspension herstellen.

Bei den Kulturen ließen sich zwei Zelltypen differenzieren, große fibroblastenähnliche Zellen mit einer Länge von 48 - 56  $\mu$  und einer Breite von 12 - 16  $\mu$  und große polygonale Zellen mit einem Durchmesser von 40 - 64  $\mu$ . Polygonale Zellen bildeten mit etwa 60 - 70% den Hauptanteil an den Kulturen.

Nach dem Dichtwachsen konnten die Kulturen bis zu 3 Monaten am Leben erhalten werden. Ähnliche Ergebnisse erzielte LANDUREAU (1968) in seinen Versuchen bei Primärkulturen.

Am besten reproduzierbare Ergebnisse wurden bei Verwendung von larvalem Regenerationsgewebe von *L e u c o p h a e a m a d e r a e* für die Herstellung von Primärzellkulturen erzielt.

Die Verwendung von Regenerationsgeweben schien besonders vorteilhaft, da es sich hier um Gewebe mit hoher mitotischer Aktivität handelte, bei dem auch in-vitro eine hohe Teilungsaktivität zu erwarten war. Diese Gewebe ließen sich leicht in ausreichender Menge für die Herstellung von Zellkulturen gewinnen. Sie eigneten sich sowohl für Explantat- als auch Zell-Kulturen.

Tatsächlich gelang in Kulturen von Regenerationsgewebe der Nachweis von Mitosen. In einer mit Vinblastin behandelten Kultur waren nach 24 Stunden in einem Zeitraum von etwa 2 Tagen 30% der Zellen in der Mitose arretiert.

Die Zellausbeute bei trypsiniertem Regenerationsgewebe beträgt etwa  $2,8 \cdot 10^6$  Zellen/g. Für ein Gramm Gewebe sind Regenerate von etwa 15 Larven im vorletzten bis letzten Larvenstadium notwendig.

Bei den Regenerationsgeweben, die sich in Zellkulturen länger als 3 Monate lang am Leben erhalten ließen, bestanden die Kulturen zu überwiegendem Teil aus Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie. Danach kamen wie bei embryonalen Zellen polygonale Zelltypen vor.

Regenerationsgewebe von *L. m a d e r a e* ist in einem anderen Zusammenhang, in physiologischen Studien, 1964 von MARKS und REINECKE für Explantatkulturen verwendet worden.

Die Kultivierung von Hämocyten war technisch am leichtesten durchführbar. Die Zellen wuchsen im Vergleich zu anderen Geweben am schnellsten zu Einschichtzellkulturen aus, (nach 2 - 3 Tagen).

Für die Herstellung dieser Kulturen wurde die Hämolymphe einer Larve pro Zellkulturröhrchen verwendet.

Die Kulturen bestanden aus sphärischen und ellipsoiden Zellen. Der Nachteil von Hämocytenkulturen war der, daß sie sich in-vitro nicht sehr lange hielten. Schon nach etwa 7 Tagen degenerierten sie im Gegensatz zu den Ergebnissen von MITSUHASHI (1967), obgleich es sich hierbei der Morphologie nach ebenfalls um Plasmacyten gehandelt hat.

Alle Versuche, eine der Zellarten zu subkultivieren, schlugen fehl. Die Gründe dafür lassen sich nur vermuten. Eine Rolle spielt dabei vielleicht die Methodik bei der Ablösung der Kulturen von der Glasunterlage. Ein weiterer Faktor könnte im Kulturmedium zu suchen sein, an das sich die Primärzellen wohl erst adaptieren müssen. Subkulturen sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einsaat der Zellen versucht worden.

Offenbar sind zur Erzielung von mehreren Subkulturen, insbesondere zur Entwicklung von Zell-Linien, ähnlich wie bei Vertebratenzellkulturen Faktoren entscheidend, die bisher weitgehend unbekannt sind. Sogar bei den relativ intensiv untersuchten Mechanismen bei der Entstehung von Zell-Linien aus Mammalia-Gewebe scheint der Zufall mehr eine Rolle zu spielen als eine gezielte Anzüchtung. Dies scheint für Arthropodenzellkulturen in noch größerem Maße der Fall zu sein.

Für die Kultivierung von *Leucophaea maderae* - Zellen eignete sich am besten das aufgrund von Hämolymphe-Analysen entwickelte Kulturmedium M-Lm. Vergleichbare Ergebnisse konnten nur mit dem von LANDUREAU (1966) entwickelten, ähnlich zusammengesetzten La-Medium erzielt werden. Ungenügende Ergebnisse erbrachten Versuche mit MARKS' M-18-Medium.

MARKS et al. (1968) sowie MARKS und LEOPOLD (1970) hatten dieses Medium für Organkulturen von *L. m a - d e r a e* mit gutem Erfolg beschrieben. In den eigenen Versuchen wuchsen zwar Zellen aus Explantaten bei Verwendung des M-18-Mediums aus, sie degenerierten aber innerhalb von 2 - 3 Tagen. Zellkulturen konnten in keinem Fall mit dem M-18-Medium zum Auswachsen gebracht werden.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich vermutlich damit erklären, daß Zellen im Gewebeverband unempfindlicher gegenüber Medieneinflüssen sind als Zellen nach enzymatischem Aufschluß der Gewebe. Die von MARKS und LEOPOLD (1970) beschriebenen Ergebnisse müssen, da sie in eigenen Untersuchungen mit dem M-18-Medium nicht reproduziert werden konnten, angezweifelt werden.

Die Untersuchung über die Eignung von *L e u c o p h a e a m a d e r a e* - Primärzellkulturen auf ihre Empfindlichkeit für Virusinfektionen wurde mit einem adaptierten Tollwut-virus-Stamm, einem virulenten Choriomeningitis Virusstamm und mit zwei bekannten "mosquito-borne"-Viren, Sindbis-Virus und Western Equine Encephalitis-Virus (WEE) durchgeführt. Tollwut-Virus sowie Sindbis- und WEE-Virus haben ein weites Wirtsspektrum in vitro und in-vivo, und es ist nachgewiesen, daß sie sich in verschiedenen Zellkulturen in-vitro auch bei supraoptimalen Temperaturen vermehren (CLARK und KOPROWSKI, 1971; SINGH und PAUL, 1968 a,b).

Für LCM-Virus ist eine Vermehrung in Zeckenzellkulturen beschrieben worden (REHACEK, 1965). Diese Ergebnisse konnten für Primärzellen aus *L e u c o p h a e a m a d e r a e* - Geweben nicht bestätigt werden. Der Temperaturfaktor kann hier ausgeschlossen werden, da REHACEK (1965) seine Versuche bei Bebrütungstemperaturen um +30°C durchführte. Dieser Befund ist insofern interessant, daß nach landläufiger Meinung Schaben als potentielle Überträger von LCM-Virus auf den

Menschen angesehen werden, ohne daß sich dafür ein exakter Nachweis führen ließ.

Am interessantesten ist der Befund, daß sich adaptiertes Tollwut-Virus sowohl in Primärkulturen von *L. m a d e r a e* als auch in SINGH's (1967) *A e d e s* - Zell-Linien vermehrt. Diesem Ergebnis kommt aus epidemiologischer Sicht erhöhte Bedeutung zu, daß in den letzten Jahren Tollwut-ähnliche Viren ohne nähere Angaben über die Spezies von Insekten isoliert werden konnte (SHOPE, pers. Mitt. 1971).

Das Virus hatte eine Präferenz für fibroblastenähnliche Zellen in Primärkulturen von *L. m a d e r a e* und in *A e d e s a l b o p i c t u s* - Zellen. Die Vermehrungsrate des Virus in den Zell-Linien war mit etwa einem Anteil von 25 - 33% der Zellen höher als in Primärzellkulturen von *L. m a d e r a e*, wo nur in etwa 5% eine Virusvermehrung stattfand.

Im Gegensatz dazu waren in der *A e d e s a e g y p t i* Zell-Linie nur Epithelzellen infiziert.

Die serienmäßige Passage des in den Zell-Linien und in Primärzellkulturen von *L. m a d e r a e* vermehrten Tollwut-Virus gelang bisher nicht. Die Gründe dafür müssen in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Ähnlich wie in einer Reihe anderer Antropodenzellen vermehren sich Sindbis- und Western Equine Encephalitis-Virus auch in *L. m a d e r a e* - Zellkulturen. Dabei scheinen die Zellen gegenüber Sindbis-Virus empfindlicher zu sein als gegenüber WEE-Virus. Sindbis-Virus vermehrte sich etwa 100fach in den Kulturen, WEE hingegen nur etwa 20fach. Beide Viren ließen sich in Passagen weiterzüchten, ein cytopathischer Effekt trat nicht auf.

Die Infektiositätstiter, die in *L. maderae* - Zellen erzielt wurden, lagen bei etwa  $10^3$  KID<sub>50</sub>/0,1 ml wesentlich unter dem infizierter Kontrollkulturen (embryonale Hühnerfibroblasten), wo Titer von  $10^{5,5}$ - $10^{6,0}$ /0,1 ml für beide Viren erreicht wurden.

Sindbis-Virus vermehrte sich in Stechmückenzellen nur etwa 50fach (HSU, 1971), in Kulturen von *Hyalomma dromedarii* (REHACEK, 1965 b) etwa  $10^5$ fach, während REHACEK (1968) in der Zell-Linie *Aedes aegypti* keine Virusvermehrung feststellte. SINGH und PAUL (1968 a, b) demonstrierten dagegen das Wachstum von Sindbis-Virus in SINGH's (1967) *Aedes albopictus* - Linie.

WEE-Virus vermehrte sich gut in *H. dromedarii* - Zellen ( $10^5$ fach) (REHACEK, 1965) während es sich in GRACE's (1962) *Antheraea eucalypti* - Zell-Linien nicht vermehren ließ.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich erkennen, daß primäre Insektenzellen verschiedener Spezies sowie Zell-Linien derselben Spezies eine unterschiedliche Empfänglichkeit für verschiedene Virusarten besitzen. Es ist bisher nicht gelungen, eine Zellart von Arthropoden zu kultivieren, die ein weites Wirtsspektrum besitzt.

Die hier beschriebenen Zell-Kulturen aus Regenerationsgewebe der Schabe *Leucophaea maderae* waren für allen verwendeten Viren bis auf LCM-Virus empfänglich. Diese Zellen könnten sich bei weiteren Untersuchungen als gut geeignet für in-vitro-Studien von Wirts-Virus-Beziehungen bei Arthropoden erweisen.

## E ZUSAMMENFASSUNG

Für die Kultivierung von Zellen der Schabe *Leucophaea maderae* F. (Blattaria) wurde ein auf Hämolymphe-Analysen basierendes Nährmedium entwickelt, das allen anderen bisher bekannten und verwendeten Kulturmedien überlegen war.

Mit diesem Medium ließen sich Zellkulturen aus embryonalen Geweben und aus Regenerationsgeweben von Larven nach Trypsinaufschluß sowie von Hämocyten, die mit der Hämolymphe direkt in das Medium getropft wurden, züchten. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Die Kulturen hielten sich, bis auf Hämocyten, die nach 7 Tagen degenerierten, für etwa 3 Monate lebensfähig. Subkulturen gelangen zu keinem Zeitpunkt nach Einsaat der Zellen.

*L. maderae* - Primärzellen waren für attenuiertes Tollwut-Virus (Stamm ERA), Sindbis- und Western Equine Encephalitis-Virus empfänglich. Bei Tollwut-Virus wurde eine Vermehrung nur in fibroblastenähnlichen Zellen mit Hilfe der Immunofluoreszenz festgestellt. Serienmäßige Viruspassagen gelangen mit Tollwut-Virus nicht.

Darüber hinaus vermehrte sich das Tollwut-Virus in SINGH's (1967) *Aedes* - Zell-Linien. In etwa 25 - 33% aller Zellen konnte die Vermehrung nachgewiesen werden.

Sindbis- und WEE-Virus vermehrten sich mit Titern von etwa  $10^3$  KID<sub>50</sub>/0,1 ml, wobei die Zellen empfänglicher für die Infektion von Sindbis- als für WEE-Virus waren. Beide Virusarten konnten serienmäßig passiert werden.

Die Vermehrung des Virus der Lymphocytären Choriomeningitis gelang nicht.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die routinemäßige Verwendung von Primärzellkulturen von *L. maderae* für die Erforschung animaler Virusinfektionen in Arthropodenvektoren diskutiert.

## E SUMMARY

These investigations describe the development of a medium for cultivation of tissues from the cockroach *Leucophaea maderae* F. (Blattaria) based on analyses of hemolymph. This medium was superior to all other culture media tested.

Good results were obtained with this medium in establishing primary cell cultures from embryonic and regeneration tissues after dissoziation with trypsin. Furthermore hemocytes were cultivated after letting hemolymph drop directly into the medium. The results were reproducible. The cultures were kept for over three months, except hemocytes, which degenerated after seven days. All subculture experiments were unsuccessful.

Primary cell cultures from *L. maderae* were susceptible for attenuated rabies virus (Strain ERA), for Sindbis Virus and Western Equine Encephalitis-Virus. With rabies multiplication could be demonstrated in fibroblast-like cells by means of fluorescent antibody staining.

In addition rabies virus also replicated in SINGH's (1967) *Aedes* cell lines. About 25-33% of all cells were FA - positive. Continuous passages of rabies virus failed in all three cell systems.

Sindbis and WEE Virus multiplied to infectivity titers of  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. *L. maderae* cells were more susceptible to infection with Sindbis Virus than WEE Virus. Both viruses could be propagated continuously in these cells.

The replication of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in *L. maderae* cells was unsuccessful.

The results are discussed with respect to a routine application of primary cells from *L. maderae* tissues for research of animal virus infections in arthropod vectors.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- ARNOLD, J.W.: The haemocytes of the Mediterranean flour moth, Ephistia Kuniella Zell (Lepidoptera: Pyralidae).  
Canad. J. Zool. 30, 352 (1952)
- ARVY, L. und M. GABE: Sur la multiplication in vitro des cellules sanguines de Forficula auricularia L.  
Compt. Rend. Soc. Biol. 140, 787 (1946)
- BANERJEE, K. und K.R.P. SINGH: Establishment of carrier cultures of Aedes albopictus cell line infected with arboviruses.  
Indian J. med. Res. 56, 812 (1968)
- BANERJEE, K. und K.R.P. SINGH: Loss of mouse virulence in Chikungunya virus from the carrier culture of Aedes albopictus cell line.  
Indian J. med. Res. 57, 1003 (1969)
- BECKEL, W.E.: Maintenance of adult mosquito tissue in a tissue-culture medium.  
Nature 177, 534 (1956)
- BHAT, U.K.M. und K.R.P. SINGH: Establishment of a diploid cell line from larval tissues of Aedes vittatus (Bigot, 1861).  
Curr. Sci. 39, 388 (1970)
- BODENSTEIN, D.: Contributions to the problem of regeneration in insects.  
J. exp. Zool. 129, 209 (1955)
- BUCKLEY, S.M.: Susceptibility of the Aedes albopictus and Aedes aegypti cell lines to infection with arboviruses.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 625 (1969)

- BUCKLEY, S.M.: Multiplication of Chikungunya and O'nyong nyong viruses in SINGH's Aedes cell lines.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 133 (1971 a)
- BUCKLEY, S.M. Infection of an Aedes albopictus cell line with an arbovirus isolated from Anopheline mosquitos.  
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 65, 535 (1971 b)
- CARLSON, J.G.: The grasshopper neuroblast culture technique and its value in radiobiological studies.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 95, 932 (1961)
- CHAO, J. und G.H. BALL: A cell line isolated from hemocytes of Samia cynthia pupae.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 28 (1971)
- CHIU, R.J. und L.M. BLACK: Monolayer cultures of insect cell lines and their inoculation with a plant virus.  
Nature 215, 1076 (1967)
- CHIU, R.J., D.V.R. REDDY und L.M. BLACK: Inoculation and infection of leafhopper tissue cultures with a plant virus.  
Virology 30, 562 (1966)
- CLARK, A.J. und K. BLOCK: The absence of sterol synthesis in insects.  
J. biol. Chem. 234, 2578 (1959)
- CLARK, F.W. und D.S. CHADBOURNE: The haemocytes of nondiapause and diapause larvae and pupae of the pink bollworm.  
Ann. Ent. Soc. Am. 53, 682 (1960)
- CLARK, H.F. und H. KOPROWSKI: Isolation of temperature sensitive conditioned lethal mutants of "fixed" rabies virus.  
J. Virol. 7, 295 (1971)
- CONVERSE, J.L. und S.C. NAGLE jr.: Multiplication of yellow fever virus in insect tissue cell cultures.  
J. Virol. 1, 1096 (1967)

- DAY, M.F. und T.D.C. GRACE: Culture of insect tissues.  
Ann. Rev. Entomol. 4, 17 (1959)
- DULBECCO, R. und M. VOGT: Plaque formation and isolation  
of pure lines with poliomyelitis viruses.  
J. exp. Med. 99, 167 (1954)
- FAGLE, H.: The specific amino acid requirements of a human  
carcinoma cell (Strain HeLa) in tissue culture.  
J. exp. Med. 102, 37 (1955)
- FAGLE, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.  
Science 130, 432 (1959)
- FARLE, W.R.: A technique for adjustment of oxygen and carbon  
dioxide tensions, and hydrogen ion concentration, in  
tissue cultures planted in Carrel flasks.  
Arch. exp. Zellforsch. 16, 116 (1954)
- LIER, G. und A. OHANESSIAN: Une souche stabilisée de  
cellules embryonnaires de Drosophila.  
2. Int. Colloq. Tissue Culture Invert. Tremezzo-Como,  
Italien 1967 (1968)
- ECHALIER, G. und A. OHANESSIAN: Isolement, en cultures in  
vitro de lignées cellulaires diploïdes de D. melano-  
gaster.  
C.R. Acad. Sci. 268, 1771 (1969)
- ECHALIER, G. und A. OHANESSIAN: in vitro culture of Drosophila  
melanogaster embryonic cells.  
In Vitro 6, 162 (1970)
- EIDE, P.E. und T.H. CHANG: Cell cultures from dispersed  
embryonic house fly tissues.  
Exp. Cell Res. 54, 302 (1969)

- ELLGAARD, E.G. und G.R. KESSEL: Effects of high salt concentration on salivary gland cells of Drosophila virilis.  
Exp. Cell Res. 42, 302 (1966)
- FILSHI, B.K. und J. REHACEK: Studies of the morphology of Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis viruses growing in cultured mosquito cells.  
Virology 34, 435 (1968)
- FISCHER, J. und G. GOTTSCHESKI: Gewebekultur bei Drosophila.  
Naturwiss. 22, 391 (1939)
- FLORKIN, M. und C.H. JEUNIAUX: Hemolymph composition. Aus: The physiology of insecta (ed. M. ROCKSTEIN) 3, 109, Academic Press (1964)
- FUJITA, N., Y. YASUI, S. KITAMURA und S. HOTTA: Cultivation of Japanese encephalitis (JE) virus in primary Culex mosquito tissue cultures.  
Kobe J. med. Sci. 14, 241 (1968)
- GLASER, R.W.: The growth of insect blood cells in vitro.  
Psyche 24, 1 (1917)
- GOLDSCHMIDT, R.: Some experiments on spermatogenesis in vitro.  
Proc. nat. Acad. Sci. 1, 220 (1915)
- GRACE, T.D.C.: Effects of various substances on growth of silk worm tissues grown in vitro.  
Austr. J. Biol. Sci. 11, 407 (1958)
- GRACE, T.D.C.: Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro.  
Nature 195, 788 (1962)

GRACE, T.D.C.: Insect tissue and cell culture.

Aus. Post-Graduate Course in Cell Culture, ed.  
D.O.White, 229 (1963) Melbourne, Australien

GRACE, T.D.C.: Establishment of a line of mosquito (Aedes aegypti L.) cells grown in vitro.  
Nature 211, 366 (1966)

GRACE, T.D.C.: Establishment of a line of cells from the silk worm Bombyx mori.  
Nature 216, 613 (1967)

GRACE, T.D.C.: The development of clones from lines of Antheraea eucalypti cells grown in vitro.  
Exp. Cell Res. 52, 451 (1968)

GRACE, T.D.C. und H.W. BRZOSTOWSKI: Analysis of the amino acids and sugars in an insect cell culture medium during cell growth.  
J. Insect Physiol. 12, 625 (1966)

HAINES, T.W.: Tissue culture of Aedes aegypti cell and its application in studies on the behavior of Eastern equine encephalomyelitis virus.  
Diss. Abstr. 20, 31 (1959)

HANN, W.D. und R.B. CLARKE: Attempts to grow Tacaribe and Junin viruses in GRACE's continuous line of moth cells.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 149 (1971)

HANNOUN, C. und G. ECHALIER: Arbovirus multiplication in an established diploid cell line of Drosophila melanogaster.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 227 (1971)

- HARRISON, R.G.: Observations on the living developing nerve fiber.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 4, 140 (1907)
- HINK, W.F.: Established insect cell line from the cabbage looper, Trichoplusia ni.  
Nature 226, 466 (1970)
- HINK, W.F. und B.J. ELLIS: Establishment and characterization of two new cell lines (CP-1268 and CP-169) from the codling moth, Carpocapsa pomonella (with a review of culture of cells and tissues from lepidoptera).  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 19 (1971)
- HINK, W.F. und C.M. IGNOFFO: Establishment of a new cell line (IMC-HZ-1) from ovaries of cotton bollworm moths, Heliothis zea (Boddie).  
Exp. Cell Res. 60, 307 (1970)
- HIRUMI, H. und K. MARAMOROSCH: Cultivation of leafhopper (Cicadellidae) tissues and organs in vitro.  
Ann. Epiphyties 14 (no. hors sér. III), 77 (1963)
- HIRUMI, H. und K. MARAMOROSCH: The in vitro cultivation of embryonic leafhopper tissues.  
Exp. Cell Res. 36, 625 (1964 a)
- HIRUMI, H. und K. MARAMOROSCH: Insect tissue culture use of blastokinetic stage of leafhopper embryo.  
Science 144, 1465 (1964 b)
- HIRUMI, H. und K. MARAMOROSCH: Electron microscopy of wound tumor virus in cultured embryonic cells of the leafhopper Macrosteles fascifrons.  
2. Int. Colloq. Invertebrate Tissue Culture 203 (1968)

- HORIKAWA, M. und A.S. FOX: Culture of embryonic cells of Drosophila melanogaster in vitro.  
Science 145, 1437 (1964)
- HORIKAWA, M. und Y. KURODA: In vitro cultivation of blood cells of Drosophila melanogaster in a synthetic medium.  
Nature 184, 2017 (1959)
- HSU, S.H.: Preliminary observations on growth of arboviruses in a newly established line of mosquito cell (Culex quinquefasciatus Say).  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 140 (1971)
- HSU, S.H., W.H. MAO und J.H. CROSS: Establishment of a line of cells derived from ovarian tissue of Culex quinquefasciatus Say.  
J. med. Ent. 7, 703 (1970)
- MULL, R.N., W.R. CHERRY und O.J. THRITCH: Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK-1, LLC-MK-2 and LLC-MK-2 (NCTC-3196) and their utility in virus research.  
J. exp. Med. 115, 903 (1962)
- JENKIN, H., D. TOWNSEND, S. MAKINO und T. YANG: Comparative lipid analysis of Aedes aegypti and Monkey Kidney Cells (MK-2) cultivated in vitro.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 97 (1971)
- JOHNSON, J.W.: Growth of Venezuelan, and Eastern, equine encephalomyelitis viruses in tissue cultures of minced Aedes aegypti larvae.  
Amer. J. trop. Med. Hyg, 18, 103 (1969)

- JOHNSON, J.W.: Susceptibility of tissue cultures of minced Aedes aegypti pupae and adults to infection with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Amer. J. trop. Med. Hyg. 20, 761 (1971)
- JONES, B.M.: The cultivation of insect cells and tissues. Biol. Rev. 37, 512 (1962)
- KITAMURA, S.: The in vitro cultivation of tissues from the mosquito Culex pipiens var. molestus. I. Cultivation of ovary tissues in vitro. Kobe J. med. Sci. 10, 85 (1964)
- KITAMURA, S.: The in vitro cultivation of tissues from the mosquito Culex pipiens var. molestus. II. An improved culture medium useful for ovarian tissue culture. Kobe J. med. Sci. 11, 23 (1965)
- KITAMURA, S.: Establishment of cell line from Culex mosquito Kobe. J. med., Sci, 16, 41 (1970)
- KURODA, Y.: Growth and differentiation of embryonic cells of Drosophila melanogaster in vitro. Jap. J. Genet. 44, 42 (1969)
- KURODA, Y.: Differentiation of ommatidium-forming cells of Drosophila melanogaster in organ culture. Exp. cell Res. 59, 429 (1970)
- KURTTI, T.J. und M.A. BROOKS: Growth of lepidopteran epithelial cells and hemocytes in primary cultures. J. Invert. Pathol. 15, 341 (1970)
- LAMPEN, J.O., W.L. McLellan, jr. und M.A. EL-NAKEEB: Antibiotics and fungal physiology. Antimicrobial Agents Chemotherapy 5, 1006 (1965)

- LANDUREAU, J.-C.: Cultures in vitro de cellules embryonnaires de Blattes.  
Exp. Cell Res. 41, 545 (1966)
- LANDUREAU, J.C.: Cultures in vitro de cellules embryonnaires de Blattes. II. Obtention de lignées cellulaires à multiplication continue.  
Exp. Cell. Res. 50, 323 (1968)
- LANDUREAU, J.C.: Étude des exigences d'une lignée de cellules d'insectes (souche EPa). II. Vitamines hydrosolubles.  
Exp. Cell Res. 54, 399 (1969)
- LANDUREAU, J.C. und P. JOLLÉS: Étude des exigences d'une lignée de cellules d'insectes (souche EPa) I. Acides aminés.  
Exp. Cell Res. 54, 391 (1969)
- LARSEN, W.: Cell proliferation in an insect tissue culture.  
Life Sci. 3, 103 (1964)
- LARSEN, W.: Growth in an insect organ culture.  
J. Insect Physiol. 13, 613 (1967)
- LESSEPS, R.J.: Culture of dissociated Drosophila embryos: aggregated cells differentiate and sort out.  
Science 148, 502 (1965)
- LEWIS, M.R.: Sea water as a medium for tissue cultures.  
Anat. Record 10, 287 (1916)
- LEWIS, M.R. und W.R.B. ROBERTSON: The mitochondria and other structures observed by the tissue culture method in the male germ cells of Chorthippus curtipennis Scudd.  
Biol. Bull. 30, 99 (1916)

- LOEB, M.J. und H.A. SCHNEIDERMAN: Prolonged survival of insect tissues in vitro.  
Ann. Entomol. Soc. Am. 49, 493 (1956)
- LÜSCHER, M.: A method for observing growing epithelial tissue in Rhodnius prolixus (Hemiptera)  
Nature 160, 873 (1947)
- MARKS, E.P. und R.A. LEOPOLD: Cockroach leg regeneration: Effects of ecdysterone in vitro.  
Science 167, 61 (1970)
- MARKS, E.P. und J.P. REINECKE: Regenerating tissues from the cockroach leg: A system for studying in vitro.  
Science 143, 961 (1964)
- MARKS, E.P., J.P. REINECKE und R.A. LEOPOLD: Regenerating tissues from the cockroach Leucophaea maderae: Nerve regeneration in vitro.  
Biol. Bull. 135, 520 (1968)
- MARTIGNONI, M.E. und R.J. SCALLION: Preparation and uses of insect hemocyte monolayers in vitro.  
Biol. Bull. 121, 507 (1961)
- MARTIN, H.M. und B.O. VIDLER: In vitro growth of tick tissues (Rhipicephalus appendiculatus Neumann, 1901)  
Exp. Parasit. 12, 192 (1962)
- MAZZONE, H.M.: Cultivation of gypsy moth hemocytes.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 196 (1971)
- McHALE, J.S. und B.H. SWEET: Morphological and cultural characteristics of Culiseta inornata and Aedes vexans mosquito cell lines.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 42 (1971)

- MITSUHASHI, J.: Tissue culture of the rice stem borer,  
Chilo suppressalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae)  
I. Cell migration from the explanted tissues of  
diapausing larvae.  
Japan J. appl. entomol. Zool. 2, 217 (1965)
- MITSUHASHI, J.: Tissue culture of the rice stem borer,  
Chilo suppressalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae).  
II. Morphology and in vitro cultivation of hemocytes.  
Appl. Ent. Zool. 1, 5 (1966)
- MITSUHASHI, J.: Establishment of an insect cell strain  
persistently infected with an insect virus.  
Nature 215, 863 (1967 a)
- MITSUHASHI, J.: An observation on the formation of a  
binucleate cell in the primavry cultures of leaf-  
hopper embryonic cells.  
Exp. Cell Res. 48, (1967 b)
- MITSUHASHI, J.: Tissue culture of the rice stem borer,  
Chilo suppressalis Walker. III. Effects of tempera-  
tures and cold storage on the multiplication of the  
cell line from larval hemocytes.  
Appl. Entomol. Zool. 3, 1 (1968)
- MITSUHASHI, J. und K. MARAMOROSCH: Aseptic cultivation  
of four virustransmitting species of leafhopper  
(Cicadellidae)  
Contr. Boyce Thompson Inst. 22, 165 (1963)
- MITSUHASHI, J. und K. MARAMOROSCH: Leafhopper tissue cul-  
ture: Embryonic, nymphal and imaginal tissues from  
aseptic insects.  
Contr. Boyce Thompson Inst. 22, 435 (1964)

NAGLE, S.C. jr., W.C. CROTHERS und L.N.HALL: Growth of moth cells in suspension in hemolymph-free medium.

Appl. Microbiol. 15, 1497 (1967)

NEEDHAM, A.E.: Regeneration and wound healing.

Methuen & Co., London 152 pp (1952)

O'BRIEN, R.D. und L.S. WOLFE: Radiation, radioactivity and insects, S. 88, Academic Press (1964)

O'FARREL, A. und A. STOCK: Regeneration and the molting cycle in Blatella germanica L. I. Single regeneration initiated during the first instar. Austr. J. Biol. Sci. 6, 485 (1953)

PAUL, S.D. und K.R.P. SINGH: Comparative sensitivity of mosquito cell lines, Vero cell line and infant mice to infection with arboviruses. Curr. Sci. 38, 241 (1969)

PAUL, S.D. K.R.P. SINGH und U.K.M. BHAT: A study of the cytopathic effect of arboviruses on cultures from Aedes albopictus cell line. Indian J. med. Res. 57, 339 (1969)

PAVRI, K.M. und S.N. GHOSH: Complement fixation tests for simultaneous isolation and identification of Dengue viruses, using tissue cultures. Bull. Wld. Hlth. Org. 40, 984 (1969)

- PELEG, J.: Growth of mosquito tissues in vitro.  
Nature 206, 427 (1965)
- PELEG, J.: Growth of arboviruses in primary tissue culture  
of Aedes aegypti embryos.  
Amer. J. trop. Med. Hyg. 17, 219 (1968 a)
- PELEG, J.: Growth of arboviruses in monolayers from  
subcultured mosquito embryo cells.  
Virology 35, 617 (1968 b)
- PELEG, J.: Behaviour of infectious RNA from four different  
viruses in continuously subcultured Aedes aegypti  
mosquito embryo cells.  
Nature 221, 193 (1969 a)
- PELEG, J.: Inapparent persistent virus infection in conti-  
nuously grown Aedes aegypti mosquito cells.  
J. gen. Virol. 5, 463 (1969 b)
- PELEG, J.: Studies on the behavior of arboviruses in an  
Aedes aegypti mosquito cell line.  
Arch. ges. Virusforsch. 37, 54 (1971 a)
- PELEG, J.: Attenuation of Semliki Forest (SF) Virus in  
continuously cultured Aedes aegypti mosquito cells  
(PELEG) as a step in production of vaccines.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 155 (1971 b)
- PELEG, J. und W. TRAGER: Growth of West Nile virus in insect  
tissue cultivated in vitro.  
Ann. Épiphyties 14, 211 (1963)
- PFIEFFER, S.E. und L.J. TOLMACH: Selecting synchronous  
populations of mammalian cells.  
Nature 213, 139 (1967)

PUDNEY, M. und M.G.R. VARMA: Anopheles stephensi var. mysorensis: Establishment of a larval cell line (Mos. 43)

Exp. Parasit. 29, 7 (1971)

RAHMAN, S.B., D. PERLMAN und S.S. RISTICH: Growth of insect cells in tissue culture.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 59, 123 (1966)

REHACEK, J.: Preliminary report on tick tissue culture, Acta virol. 2, 253 (1958)

REHACEK, J.: An improved method of tick tissue cultures. Acta virol. 6, 188 (1962)

REHACEK, J.: Propagation of tick-borne encephalitis (T.E.) virus in tick tissue cultures. Ann. Épiphyties 14, 199 (1963)

REHACEK, J.: Relation between viruses and tick tissues in vitro.

Proc. XII. Int. Congr. Ent. 774 (1965 a)

REHACEK, J.: Cultivation of different viruses in tick tissue cultures.

Acta virol. 9, 332 (1965 b)

REHACEK, J.: Preparation of tissue cultures from the tick Hyalomma dromedarii Koch.

J. Med. Ent. 2, 161 (1965 c)

REHACEK, J.: The growth of arboviruses in mosquito cells in vitro.

Acta virol. 12, 241 (1968 a)

REHACEK, J.: Persistent infection of mosquito cells grown in vitro with Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis viruses.  
Acta virol. 12, 340 (1968 b)

REHACEK, J.: Present status of tick tissue culture.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 32 (1971)

REHACEK, J. und H.W. BRZOSTOWSKI: A tick tissue culture medium based on analyses of tick hemolymph.  
J. Insect Physiol. 15, 1431 (1969 a)

REHACEK, J. und H.W. BRZOSTOWSKI: The utilization of amino acids and sugars by tick cells cultivated in vitro.  
J. Insect. Physiol. 15, 1683 (1969 b)

REHACEK, J. und O. KOZUCH: Comparison of the susceptibility of primary tick and chick embryo cell cultures to small amounts of tick-borne encephalitis virus.  
Acta virol. 8, 470 (1964)

REHACEK, J. und O. KOZUCH: The use of Hyalomma dromedarii tick tissue for the isolation of tick-borne encephalitis virus from its natural foci.  
Acta virol. 13, 253 (1969)

REHACEK, J. und J. PESEK: Propagation of Eastern equine encephalomyelitis (EEE) virus in surviving tick tissues.  
Acta virol. 4, 241 (1969)

- REHACEK, J., T. DOLAN, K. THOMPSON, R.G. FISCHER, Z. REHACEK  
und H. JOHNSON: Cultivation of oncogenic viruses in  
mosquito cells in vitro.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 161 (1971)
- RINALDINI, L.M.: A quantitative method for growing animal  
cells in vitro.  
Nature 173, 1134 (1954)
- ROSENBERGER, C.R. und J.C. JONES: Studies on total blood  
cell counts of the southern army worm larvae,  
Prodenia eridania (Lepidoptera).  
Ann. Ent. Soc. Am. 53, 351 (1960)
- SCHNEIDER, I.: Establishment of three diploid cell lines  
of Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)  
J. Cell. Biol. 42, 603 (1969)
- SCHNEIDER, I.: Cultivation of Dipteran cells in vitro.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 1 (1971)
- SCHUHNECHT, W. und H. SCHINKEL: Beitrag zur Beseitigung  
der Anregungsbeeinflussung bei flammenspektralanalytischen  
Untersuchungen.  
Z. analyt. Chem. 194, 161 (1963)
- SCHWÖBEL W. und E. TRAUB: Erfahrungen bei der Züchtung von  
Maul- und Klauenseuchevirus in Schweinenierenzellen  
unter besonderer Berücksichtigung der Gefrierfähigkeit  
des Kulturvirus.  
Monh. Tierheilkd. 11, 13 (1959)
- SEN GUPTA, K.: Studies on insect tissue culture. I. Culture  
of tissues from the wax moth, Galleria mellonella L.  
in vitro  
Folia biol. 7, 400 (1961)

- SEN GUPTA, K.: Studies on the specificity of haemolymph from different insects for the culture of tissues from other insects.  
Proc. Indian Acad. Sci. 59, 103 (1964)
- SHINEDLING, S.T. und B. GREENBERG: Culture of cells of the flesh fly, Sarcophaga bullata.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 12 (1971).
- SINGH, K.R.P.: Cell cultures derived from larvae of Aedes albopictus (Skuse) and Aedes aegypti (L.)  
Curr. Sci. 37, 65 (1967)
- SINGH, K.R.P.: Growth of arboviruses in Aedes albopictus and A. aegypti cell lines.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 127 (1971)
- SINGH, K.R.P. und S.D. PAUL: Multiplication of arboviruses in cell lines from Aedes albopictus and Aedes aegypti.  
Curr. Sci. 37, 65 (1968 a)
- SINGH, K.R.P. und S.D. PAUL: Susceptibility of Aedes albopictus and Aedes aegypti cell lines to infection by arbo and other viruses.  
Indian J. med. Res. 56, 815 (1968 b)
- SOHI, G.S.: Adaptation of an Aedes aegypti cell line to hemolymph-free culture medium.  
Can. J. Microbiol. 15, 1197 (1969)
- STANLEY, M.E. und J.L. VAUGHN: Marked sensitivity of insect cell lines to Fungizone (Amphotericin B).  
J. Insect Physiol. 13, 1613 (1967)
- STERN, C.: Growth in vitro of the testis of Drosophila.  
Growth 4, 377 (1940)

- STEVENS, T.M.: Arbovirus replication in mosquito cell lines (SINGH) grown in monolayer or suspension culture (34793).  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 134, 356 (1970)
- SUITOR, E.C.jr.: Growth of Japanese encephalitis virus in GEACE's continuous line of moth cells.  
Virology 30, 134 (1966)
- SUITOR, E.C.jr.: Plaque formation by an arbovirus in a mosquito cell line.  
J. gen. Virol. 2, 545 (1969)
- SUITOR, E.C. jr. und F.J. PAUL: Syncytia formation of mosquito cell cultures mediated by type 2 Dengue virus.  
Virology 32, 422 (1969).
- SUITOR, E.C. jr., L.L. CHANG und H.H. LIU: Establishment and characterization of a clone from GEACE's in vitro cultured mosquito (Aedes aegypti L.)  
Exp. Cell Res. 44, 572 (1966)
- SWEETLEY, C.C., R. BENTLEY, N. MAKITA und W.F. WELLS: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.  
J. Chem. Soc. 85, 2497 (1963)
- SWEET, B.H. und L.T. DUPREE: Growth of cells derived from Culiseta inornata and Aedes vexans in tissue culture. A preliminary note.  
Mosquito News 28, 368 (1968)
- SWEET, B.H. und H.D. UPPHAM: A comparative study of the viral susceptibility of monolayer and suspended mosquito cell lines.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 150 (1971)

- TAYLOR, A. Experimentally induced changes in the cell complex of the blood of Periplaneta americana (Blattidae: Orthoptera).  
Ann. Ent. Soc. Am. 28, 135 (1935)
- TING, K.Y. und M.A. BROOKS: Sodium:potassium ratios in insect cell culture and the growth of cockroach cells.  
Ann. Entomol. Soc. Am. 58, 197 (1965)
- TOKUMITSU, T. und K. MARAMOROSCH: Survival of aphid cells in vitro.  
Exp. Cell Res. 44, 652 (1966)
- TOKUMITSU, T. und K. MARAMOROSCH: Cytoplasmic protrusions in insect cells during mitosis in vitro.  
J. Cell Biol. 34, 677 (1967)
- TRAGER, W.: Cultivation of the virus of grasserie in silk worm tissue cultures.  
J. exp. Med. 61, 501 (1935)
- TRAGER, W.: Multiplication of the virus of equine encephalomyelitis in surviving mosquito tissues.  
J. trop. Med. 18, 387 (1938)
- VAGO, C. und S. CHASTANG: Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés.  
Experientia 14, 110 (1958)
- VAGO, C. und S. CHASTANG: Culture de Borrelia dans les organes d'insectes en survie.  
C.R. Acad. Sci. 251, 903 (1960)

- VAGO, C. und O. FLANDRE: Culture prolongée de tissu d'insectes et de vecteurs de maladies en coagulum plasmatique.  
Ann. Epiphyties 14 (no.hors sér. III) 127 (1963)
- VARMA, M.G.R. und M. PUDNEY: The culture of embryonic cells from the bug Triatoma maculata (Erichson)  
Exp. Cell Res. 45, 671 (1965)
- VARMA, M.G.R. und M. PUDNEY: The growth and serial passage of cell lines from Aedes aegypti (L.) larvae in different media.  
J. med. Entomol. 6, 432 (1969)
- VAUGHN, J.L. und M.S. STANLEY: A micromethod for the assay of Insekt viruses in primary cultures of insect tissue.  
J. Invert. Pathol. 16, 357 (1970)
- VAUGHN, J.L., S.J. LOULOUDES and K.DOUGHERTY: The uptake of free and serum-bound sterols by insect cell in vitro.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 92 (1971)
- WERMEL, E.M.: Die Explantation des Blutes von Seidenspinner-raupen,  
Bull. Biol. Med. exptl.5, 6 (1938)
- WHITNEY, E. und R. DEIBEL: Growth studies of California encephalitis virus in two Aedes mosquito cell line cultures.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 138 (1971)
- WYATT, G.R.: The biochemistry of insect hemolymph.  
Ann. Rev. Entomol. 6, 75 (1961)
- WYATT, S.S.: Culture in vitro of tissue from the silk worm Bombyx mori L.  
J. gen. Physiol. 39, 841 (1956)

- WYATT, G.R., T.C. LOUGHEED und S.S. WYATT: The chemistry of insect hemolymph. Organic components of the hemolymph of the silk worm Bombyx mori and two other species.  
J. gen. Physiol. 39, 853 (1956)
- YANG, Y.L., D.B. STOLTZ und L. PREVEC: Growth of Vesicular Stomatitis virus in a continuous culture line of Antheraea eucalypti moth cells.  
J. gen. Virol. 5, 473 (1969)
- YUNKER, C.E.: Arthropod tissue culture in the study of arboviruses and rickettsiae: A review.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 113 (1971)
- YUNKER, C.E. und J. CORY: Growth of colorado tick fever (CTF) virus in primary tissue cultures of its vector, Dermacentor andersoni Stiles (Acarina: Ixodidae), with notes on tick tissue culture.  
Exp. Parasit. 20, 267 (1967)
- YUNKER, C.E. und J. CORY: Infektion of GRACE's Antheraea cells with arboviruses.  
Amer. J. trop. Med. Hyg. 17, 889 (1968 a)
- YUNKER, C.E. und J. CORY: Growth of some group B arboviruses in two established insect cell lines. Proc. 23, Ann. Int. Northwest Conf. on Diseases in Nature Communicable to Man. S 79 (1968 b)
- YUNKER, C.E. und J. CORY: Colorado tick fever virus: Growth in a mosquito cell line.  
J. Virol. 3, 631 (1969)
- YUNKER, C.E., J.L. VAUGHN und J. CORY: Adaptation of insect cell line (GRACE's Antheraea cells) to medium free of insect hemolymph.  
Science 155, 1565 (1967)

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr  
bin ich für die Überlassung des  
Dissertationsthemas sowie für die  
großzügige Unterstützung bei der  
Durchführung meiner Arbeiten  
überaus dankbar.

Für die jederzeit bereitwillig  
gewährte förderliche Hilfe gilt  
Herrn Priv.Do. Dr. Peter A. Bachmann  
mein besonderer Dank.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. E. Traub  
bin ich für die wertvolle Hilfe  
bei Arbeiten mit LCM-Virus zu  
Dank verpflichtet.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle  
Herrn Priv.Do. Dr. H. Bohn für  
das Interesse an meiner Arbeit danken.

## LEBENS LAUF

Am 30. Dezember 1944 wurde ich, Gerald Jentsch, als Sohn des Dipl.-Ing. Rudolf Jentsch und seiner Ehefrau Gerda geb. Damaschun in Oebisfelde/Altmark geboren.

Im Herbst 1951 erfolgte die Einschulung in Oebisfelde. Nach dem Besuch der Grundschule in Berlin-(West) und des Gymnasiums in Darmstadt legte ich dort im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich mit dem Studium der Elektrotechnik an der damaligen Technischen Hochschule, München. Nach 4-semesterigem Studium wechselte ich die Studienfachrichtung und begann im Wintersemester 1967/68 an der Universität München mit dem Studium der Biologie. Im Sommersemester 1970 bestand ich die Diplomprüfung.

Seit dem 1. August 1970 bin ich als Doktorand an dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München angestellt.



